

**Aus der Abteilung für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. H. Renz**

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**in Zusammenarbeit mit dem
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,**

Standort Marburg

Gerinnung bei schwerer Sepsis unter besonderer Berücksichtigung der Monozyten

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Bettina Weiste
aus Koblenz**

Marburg, 2010

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 21.10.2010

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan:	Prof. Dr. med. Rothmund
Referent:	PD Dr. med. Stief
1. Korreferent:	PD Dr. med. Zeiler

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1 Extrinsische und intrinsische Gerinnungsaktivierung	6
1.2 Antikoagulatorische Mechanismen und Fibrinolyse	7
1.3 Aktivierung der Gerinnung, Antikoagulation und Fibrinolyse bei Sepsis	9
1.4 Monozyten und das mononukleäre Phagozytensystem (MPS)	11
1.5 Monozyten und Hämostaseveränderungen bei Sepsis	13
2. Material und Methoden	17
2.1 Präanalytik	17
2.2 sCD14	18
2.3 sL-Selectin	18
2.4 Phospholipase A ₂	18
2.5 Tissue factor	19
2.6 Zirkulierende amidolytische Thrombinaktivität	19
2.7 Fibrinogen-Funktion/Fibrinogen-Antigen	20
2.8 D-Dimere	20
2.9 Antithrombin III	21
2.10 Protein C	21
2.11 LPS und β -Glucane	21
2.12 Präzision der Analysen	23
2.13 Statistik	23
3. Ergebnisse	24
3.1 sCD14	26
3.2 sL-Selectin	26
3.3 Phospholipase A ₂	27
3.4 Tissue factor	28
3.5 Zirkulierende amidolytische Thrombinaktivität	29

3.6	Fibrinogen-Funktion/Fibrinogen-Antigen	29
3.7	D-Dimere	37
3.8	Antithrombin III	38
3.9	Protein C	40
3.10	LPS und β -Glucane	43

4. Diskussion 45

4.1	sCD14	45
4.2	sL-Selectin	46
4.3	Phospholipase A ₂	47
4.4	Tissue factor	48
4.5	Zirkulierende amidolytische Thrombinaktivität	49
4.6	Fibrinogen-Funktion/Fibrinogen-Antigen	51
4.7	D-Dimere	52
4.8	Antithrombin III	53
4.9	Protein C	54
4.10	LPS und β -Glucane	55

5. Zusammenfassung 57

6. Abkürzungsverzeichnis 59

7. Literaturverzeichnis 61

Anhang

Tabellarischer Lebenslauf	77
Verzeichnis der akademischen Lehrer	79
Danksagung	80
Erklärung	81

1. Einleitung

Sepsis und der septische Schock spielen mit einer Prävalenz von ca. 11 % in Deutschland in der Behandlung intensivmedizinischer Patienten eine zentrale Rolle. Die Prävalenz auf Intensivstationen in Häusern mit weniger als 200 Betten liegt zur Zeit bei ungefähr 6 %, in größeren Häusern (mehr als 600 Betten) bei 15 % und an Universitätskliniken bei ca. 19 %. Häufigste Herde sind Infekte der Atemwege und des Abdomens. Die durchschnittliche Letalität der schweren Sepsis liegt bei 55 %, wobei nur ein Viertel der verstorbenen Patienten schwerwiegende Komorbiditäten wie Herzinsuffizienz NYHA IV, dialysepflichtige Niereninsuffizienz, metastasierende Tumorerkrankungen, Leberzirrhose, schwere restriktive oder obstruktive Lungenerkrankungen oder AIDS aufwiesen [46].

Grundsätzlich können SIRS (systemic inflammatory response syndrome) infektiöser und nicht infektiöser Ursache unterschieden werden. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich vor allem mit der infektiösen Entität, also der Sepsis, insbesondere mit der durch gramnegative Bakterien oder Pilze verursachten schweren Sepsis. Bei Sepsis kommt es durch Wechselwirkungen zwischen Zellnekrose und plasmatischer Gerinnung zur pathologischen disseminierten intravasalen Gerinnung (PDIC). PDIC ist bei Sepsispatienten häufig und kann im Krankheitsverlauf bereits sehr früh auftreten.

Die freigesetzten Toxine der Erreger aktivieren massiv die Gerinnung. Es entsteht systemisch zirkulierendes Thrombin und systemisch zirkulierendes Fibrin. Die Fibrin-Ablagerungen stören die Mikrozirkulation, woraus Thrombosen und Infarkte resultieren können. Durch diese Mikrothrombosen können einzelne Organe versagen. Es kann ein Multiorganversagen entstehen, welches häufig den limitierenden Faktor des Überlebens darstellt. Selten werden Gerinnungsfaktoren und Thrombozyten massiv verbraucht („overt DIC“), was zu ernststen Blutungen führen kann.

Bis heute ist die schnelle Labordiagnose der frühen PDIC eine der größten klinischen Herausforderungen. Es gibt eine Reihe von Hämostasemarkern, welche möglicherweise die Diagnostik erleichtern [80,99], so hat sich seit einigen

Jahren eine erhöhte plasmatische Lipopolysaccharidkonzentration als einer der bedeutendsten herausgestellt. In den bisherigen Arbeiten wurden weder die Menge der freien Endotoxine, die von großer pathophysiologischer Bedeutung für die Pathogenese der Sepsis sind, noch die in vivo entstandene, systemisch zirkulierende amidolytische Thrombinaktivität quantifiziert.

In der Pathophysiologie der Sepsis sind die Monozyten des Erkrankten von Bedeutung. In dieser laborchemischen Arbeit wurden neue Methoden zur präzisen Analyse hämostatischer Veränderungen bei Sepsispatienten angewendet und die Bedeutung der Monozyten in diesem Zusammenhang untersucht.

Das extrem instabile Plasma der intensivmedizinischen Patienten wurde erstmals durch Arginin stabilisiert, um valide und reproduzierbare Messwerte zu erhalten. Neue Parameter wurden auf ihre Anwendbarkeit getestet, um eine sehr frühzeitige Diagnose der Sepsis und des pathologischen Hämostasestatus zu ermöglichen.

1.1 Extrinsische und intrinsische Gerinnungsaktivierung

Tissue factor (TF), früher auch Thromboplastin oder Faktor III genannt, wird zur Gruppe der Gerinnungsfaktoren gezählt und kommt unter physiologischen Bedingungen als integrales membrangebundenes Glykoprotein in Geweben vor, welche keinen direkten Kontakt zum Blutfluss aufweisen. Subendotheliale Schichten (glatte Muskelzellen und Fibroblasten) und die Adventitia größerer Gefäße stellen ein großes Reservoir für TF dar. Bei Gewebsverletzung kommt es durch Freisetzung des tissue factors und Interaktion mit Faktor VII oder seiner aktivierten Form (Faktor VIIa) zur Bildung des TF-VIIa-Phospholipid- Ca^{++} -Komplexes (extrinsische Tenase), der den Faktor X in Faktor Xa umwandelt [183]. Faktor Xa zusammen mit seinem Kofaktor Faktor Va aktiviert Prothrombin zu Thrombin, welches die prokoagulatorische Situation exacerbiert. Thrombin aktiviert die beiden Gerinnungsbeschleuniger Faktor V und Faktor VIII, spaltet Fibrinogen zu Fibrin und aktiviert Faktor XIII, welcher das Fibringerinnsel stabilisiert und es widerstandsfähiger gegen Plasmin macht [120, 156].

Die intrinsische Gerinnung wird durch unphysiologische Oberflächen, wie z.B. über Zelldefekte und die daraus mit dem Blut in Kontakt kommenden polynegativen Ladungen von Phospholipiden, subendotheliale Kollagen und Sulfatidgruppen, ausgelöst. Über Kontakt dieser negativ geladenen Moleküle mit Faktor XII wird Faktor XII zu Faktor XIIa aktiviert, der Präkallikrein zu Kallikrein aktiviert, welches rückgekoppelt weitere Faktor XII-Moleküle aktiviert [145]. Faktor XIIa wandelt Faktor XI zur aktiven Form XIa um. Kallikrein als Breitspektrumenzym kann auch Faktor XI oder Faktor II aktivieren. Faktor XIa aktiviert Faktor IX. Der Enzymkomplex aus Faktor IXa, Faktor VIIIa, Phospholipiden und Ca^{++} (intrinsische Tenase) aktiviert Faktor X zu Faktor Xa.

Die Endstrecke der intrinsischen Gerinnung entspricht der zuvor beschriebenen Endstrecke der extrinsischen Gerinnung und hat als Endprodukt die Bildung des Fibrinclots.

1.2 Antikoagulatorische Mechanismen und Fibrinolyse

Unter physiologischen Bedingungen inhibieren Antithrombin III, das Protein-C-System und eventuell der tissue factor pathway inhibitor (TFPI) die Gerinnungsaktivierung.

Antithrombin III, ein 58 kDa großes Glykoprotein, inaktiviert hauptsächlich Thrombin und Faktor Xa [1, 45, 55, 75, 155]. Durch Bindung an Heparin kommt es zu einer deutlichen Verstärkung und Beschleunigung der Antithrombinwirksamkeit. Es existieren zwei Isoformen des Antithrombins, welche sich in ihrer Affinität zu Heparin unterscheiden. Unter physiologischen Bedingungen sind 85 – 95 % des zirkulierenden Antithrombins an vier ihrer Asparaginmoleküle glycosyliert (α -Isoform). Die verbleibenden 5 - 15 % des zirkulierenden Antithrombins haben aufgrund einer fehlenden Glycosylierung an Asparagin 135 eine drei- bis zehnfach höhere Affinität zu Heparin (β -Isoform). Eine Unterscheidung bezüglich der thrombinhemmenden Wirksamkeit der beiden Isoformen ist nicht möglich [188].

Protein C ist ein Vitamin K abhängiges Protein und wird in der Leber als inaktive

Vorstufe synthetisiert. Protein C wird physiologischerweise durch den Thrombin-Thrombomodulin-Komplex aktiviert [47]. Aktiviertes Protein C mit seinem Kofaktor Protein S zerstört die beiden wichtigen Gerinnungsbeschleuniger Faktor Va und Faktor VIIIa. Daher ist aktiviertes Protein C antikoagulant.

TFPI kommt sowohl in endothelzellgebundener Form als auch an Lipoproteine gebunden im Plasma vor. TFPI wird überwiegend von Endothelzellen (bis zu 90 % des gesamten intravaskulären Pools) und von Thrombozyten exprimiert [33, 117]. Er hemmt den TF-VIIa-Komplex durch Formung eines quaternären Komplexes mit Faktor Xa. TFPI hat drei „Kunitz Domänen“ (K). Jede dieser Domänen ist an der tissue factor-Hemmung beteiligt. Die K2-Domäne bindet initial Faktor Xa. Der TF-VIIa-Komplex wird dann über die K1-Domäne gebunden. Die K3-Domäne bindet möglicherweise an die Zellmembran [33].

Die Abbildung 1 fasst die plasmatische Gerinnung zusammen.

Plasmin baut Fibrin ab. Plasmin wird über verschiedene Proteasen aus seinem inaktiven Vorläufer Plasminogen generiert. Die physiologischen Plasminogen-aktivatoren sind tissue-type- und urokinase-type-plasminogen-activator (t-PA bzw. u-PA). Plasminogen-activator-inhibitor-1 (PAI-1) und α_2 -Antiplasmin hemmen die Fibrinolyse und regulieren sie dadurch.

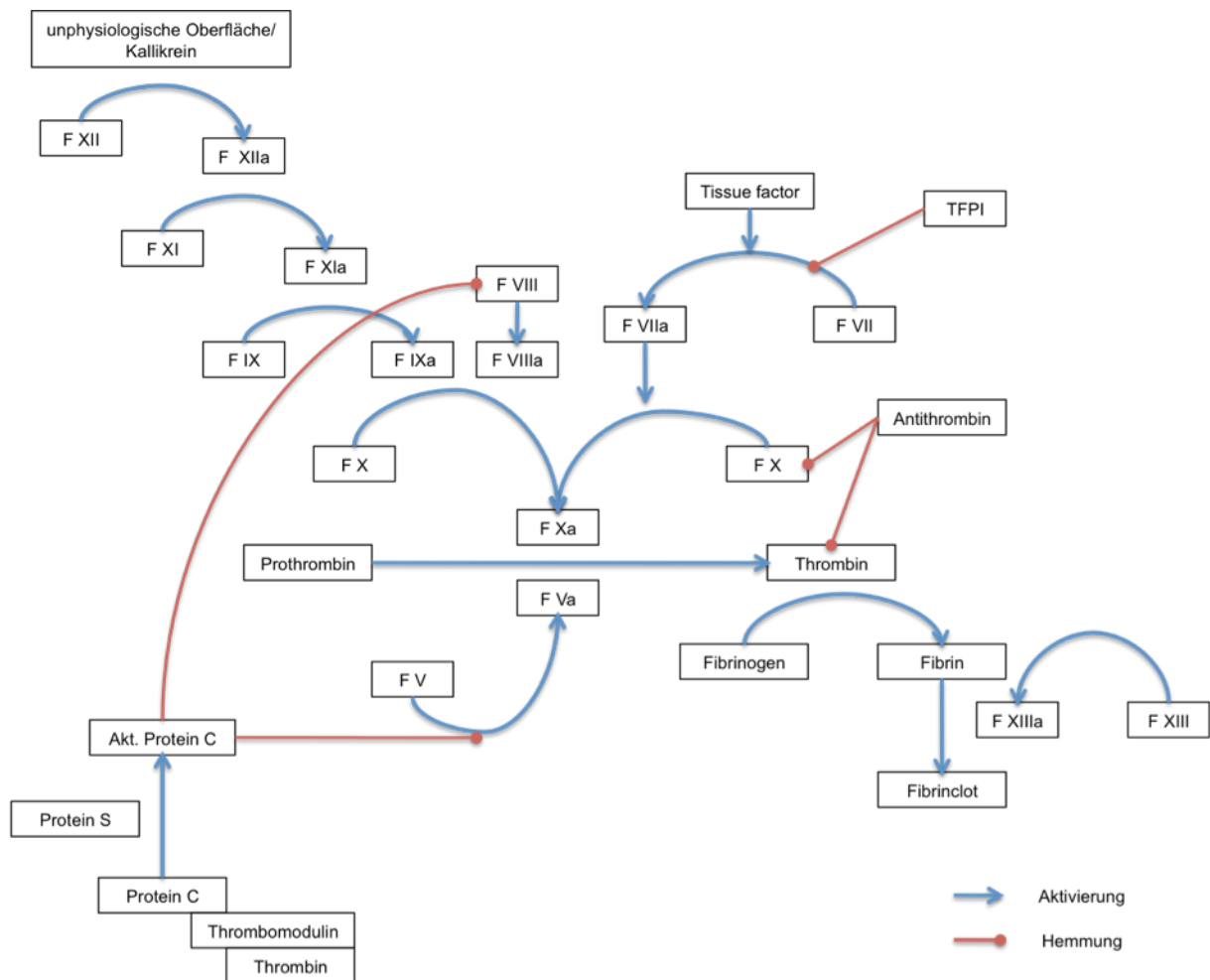


Abb. 1: Plasmatisches Gerinnungssystem

1.3 Aktivierung der Gerinnung, Antikoagulation und Fibrinolyse bei Sepsis

Die Gerinnungsaktivierung der PDIC kann je nach Grundkrankheit über den extrinsischen oder den intrinsischen Teil der Gerinnungskaskade erfolgen [4, 12, 58, 133, 183]. Unter physiologischen Bedingungen wird systemisch sehr wenig Thrombin gebildet, daher liegt die physiologische im Plasma zirkulierende amidolytische Thrombinaktivität bei der normalen intravaskulären Gerinnung (NIC) unter 7 mIU/ml. (Normalbereich: 5.5 ± 1.1 mIU/ml; $MVn \pm 1$ SDn).

Schon zu Beginn von Sepsis und daraus resultierender PDIC gibt es zahlreiche prokoagulante Veränderungen. Bei der inflammatorisch bedingten Initiation der

Gerinnungskaskade werden Monozyten, Fibroblasten und Endothelzellen durch die Freisetzung von Zytokinen, z.B. TNF α und IL-1, und Zell-Zell-Interaktionen zur Expression von tissue factor stimuliert [68, 135]. Über tissue factor und Faktor VIIa wird die extrinsische Gerinnung aktiviert und massiv systemisch zirkulierendes Thrombin und Fibrin generiert. Die entstehenden Mikrothromben stören die Mikrozirkulation. Leukozyten rollen und adhärieren stärker, was u.a. über Selectine vermittelt wird. Später invadieren die Leukozyten betroffenes Gewebe.

Die Bedeutung der intrinsischen Gerinnungskaskade im Zusammenhang mit Sepsis wird kontrovers diskutiert [22, 23, 26, 69, 89, 97, 98, 115, 127, 128, 142, 143, 154, 161, 192, 209]. In vitro konnte gezeigt werden, dass Pathogene das intrinsische System (Kontaktsystem: Faktor XII, Präkallikrein, hochmolekulares Kininogen) und die Komplementkaskade sehr früh aktivieren. Entzündungsmediatoren aus einer Reihe von Zelltypen, z.B. Monozyten und Endothelzellen, werden freigesetzt. Phospholipase A₂ bzw. Phospholipase C interagieren mit den Zellmembranen von Monozyten und Endothelzellen. Ein Membranleck entsteht, die Membranpermeabilität wird erhöht, und die Zelle stirbt. Polynegativ geladene DNA wird freigesetzt. Aber auch polynegative Phospholipide oder (sulfatierte) Glycosaminoglykane können das Kontaktsystem aktivieren [154]. Diese unphysiologischen Stoffe falten Faktor XII zu Faktor XIIa und aktivieren somit die intrinsische Gerinnung.

Das Kontaktsystem ist auch an Gefäßpermeabilität, Gefäßzellproliferation und der Fibrinolyse beteiligt [98, 127, 143].

Antithrombin III, der Inaktivator von Thrombin und Faktor Xa wird durch 1:1-Komplexbildung mit Gerinnungsproteasen verbraucht, was unter Umständen als pathologisch erhöhte Thrombin-Antithrombin-Komplex-Konzentration (TAT) in Immunoassays bei Patienten mit PDIC nachgewiesen werden kann [88, 94]. Eine massive Thrombingeneration verbraucht folglich Antithrombin. Auch Proteasen aus Leukozyten zerstören AT III, wodurch die plasmatische AT-III-Funktion weiter beeinträchtigt wird [81, 92, 131].

Die Protein-C-Funktion ist bei Sepsis oft vermindert, da Protein C verbraucht und unzureichend synthetisiert oder aktiviert wird [32, 48, 59, 118, 122].

Tissue-factor-pathway-inhibitor (TFPI) ist über Proteoglycane an das Endothel gebunden. Die während der Sepsis verminderte Synthese von Glycosaminoglycanen beeinträchtigt die TFPI-Funktion, da TFPI nur in endothelgebundener Form effizient ist [24]. Allerdings wurden keine relevanten Unterschiede in TFPI-Spiegeln zwischen Sepsispatienten und einer gesunden Kontrollgruppe gesehen [126].

Auch die Fibrinolyse ist bei Sepsis stark inhibiert [20, 174]. Bereits eine Stunde nach Endotoxinapplikation kann die Plasminogen-Aktivator-Aktivität (t-PA und u-PA) ansteigen. Plasmin wird generiert und Plasmin- α_2 -Antiplasmin-Komplexe (PAP) steigen an. Es konnte bei gesunden Probanden gezeigt werden, dass dieser anfänglichen Aktivierung der Fibrinolyse, mit einem zeitlichen Verzug von ungefähr einer weiteren Stunde nach Endotoxinämie, massiv ansteigende PAI-1-Spiegel (Plasminogen-activator-inhibitor-type-1) folgen. Diese hemmen die Fibrinolyse für mehrere Stunden [20]. Die Zusammenhänge zwischen Gerinnung und Fibrinolyse wurden von Studiengruppen wie Levi et al. und Biemond et al. im Tiermodell erforscht. Durch Gabe von Hemmstoffen der Gerinnungsaktivierung, wie z.B. Anti-TF oder monoclonale anti-VIIIa-Antikörper, konnte zwar die endotoxinvermittelte Gerinnungsaktivierung scheinbar vollständig unterbunden werden, die nachfolgende Aktivierung und Inhibition der Fibrinolyse wurde jedoch durch diese Substanzen nicht beeinflusst, sodass Gerinnung und Fibrinolyse bei Sepsis unabhängig voneinander aktiviert und reguliert werden könnten [19, 96]. Dies stünde im Widerspruch zur thrombinvermittelten Aktivierung und Hemmung der Fibrinolyse, welche durch Van Hinsberg et al., Gelehrter et al. und Giles et al. beschrieben wurden [62, 65, 193].

1.4 Monozyten und das mononukleäre Phagozytensystem (MPS)

5 - 10 % der Leukozyten im peripheren humanen Blut sind Monozyten. Sie zirkulieren dort 1 - 3 Tage. Monozyten werden im Knochenmark aus Vorläuferzellen der myeloischen Reihe wie der gemeinsamen myeloiden Vorläuferzelle

CMP und der gemeinsamen Vorläuferzelle der Granulozyten/Makrophagen GMP produziert [77]. Monozyten in Blut und Knochenmark sind Vorläufer der Makrophagen in Geweben und lymphatischen Organen und bilden einen Teil einer funktionellen Einheit, dem mononukleären Phagozytensystem (MPS). Knochenmarkvorläufer, wie Monoblasten und Promonozyten, zirkulierende Monozyten und sowohl mobile als auch sessile Gewebsmakrophagen (Histiozyten) sind Teile dieses Systems. Weiterhin werden Kupffer-Sternzellen der Leber, Sinuswand-Zellen von Milz und Lymphknoten, Alveolarmakrophagen, Microglia-Zellen des ZNS, Mesangium-Zellen der Nierenglomerula, Makrophagen von Synovial-, Pleura- und Peritonealflüssigkeit wie auch dendritische antigenpräsentierende Zellen dem MPS zugeordnet.

In vitro-Studien zeigten, dass Monozyten sich unter Einfluss von IL-4 und GM-CSF in zwei funktionell unterschiedliche Zelltypen, Makrophagen und dendritische Zellen (DC), differenzieren können [35, 148, 177]. Varol et al. und Naik et al. beschrieben, dass es sich bei klassischen dendritischen Zellen von Lymphknoten nicht um differenzierte Monozyten zu handeln schien [123, 194]. Liu et al. zeigten, dass klassische dendritische Zellen ausschließlich aus MDP (macrophage/dendritic cell progenitors) via einer alternativen, zirkulierenden Zellvorstufen-Population, den so genannten „pre-classical dendritic cells“, ausgebildet wurden [103].

Makrophagen haben eine hohe phagozytäre und intrazellulär proteolytische Aktivität und sezernieren nach Aktivierung Zytokine, welche proinflammatorische Mediatoren sind. Neben klassischen proinflammatorischen Makrophagen, die mikrobizide Aktivität zeigen und Mediatoren wie $\text{TNF}\alpha$, IL-1, IL-6 oder IL-12 zur Amplifikation der Entzündungsreaktion sezernieren, begrenzen alternativ aktivierte Makrophagen mittels anti-inflammatorischer Zytokine (z. B. IL-10) die Inflammation.

Dendritische Zellen (DC) sind eine wichtige Verbindung der angeborenen (in-naten) mit der erworbenen (adaptiven) Immunantwort. Sie phagozytieren ebenfalls stark, unterscheiden sich jedoch von den Makrophagen durch deutlich geringere Proteolyse. Nach Abbau von Antigenen zu intrazellulären Peptiden

präsentieren Monozyten mittels major histocompatibility complex (MHC) die prozessierten Antigene gegenüber T-Lymphozyten [177].

Makrophagen und dendritischen Zellen zeigen ein unterschiedliches Migrationsverhalten: Während Makrophagen, einmal ins Gewebe migriert, meist dort verbleiben, können DC aus dem peripheren Gewebe über Lymphbahnen und Lymphknoten mit T-Zellen interagieren.

Humane Monozyten-Subpopulationen sind seit längerem bekannt und viele Studien versuchten bis dato, die genaue Funktion dieser Subpopulationen zu klären. Unterschieden werden auf der Basis der Expression von CD14, einer Komponente des Lipopolysaccharid-Rezeptor-Komplexes, und CD16, des FcγRIII-Immunoglobulin-Rezeptors, neben der „klassischen“ CD14⁺⁺CD16⁻-Population, die „nicht-klassische“ CD14^{low}CD16⁺-Monozytenpopulation sowie eine „intermediäre“ CD14⁺CD16⁺-Gruppe [138]. Unterschiede finden sich u.a. in der Ausbildung von Adhäsionsmolekülen, Oberflächenmarkern und auch in unterschiedlich ausgeprägter phagozytärer Aktivität [9, 66, 177].

Die CD14⁺⁺CD16⁻-Population ist im gesunden Individuum mit ca. 80 – 90 % der Monozyten die Hauptgruppe. Während CD14⁺-Monozyten CCR1, CCR2, CXCR2 und geringe Mengen von CX3CR1 exprimieren, bilden CD16⁺-Monozyten große Mengen von CX3CR1 und geringe Mengen CCR2 aus [6, 205]. Von CD14⁺-Monozyten werden im Vergleich zu CD16⁺-Monozyten größere Mengen von CD62L (L-Selectin) und CD11b, jedoch geringere Mengen des MHC-II exprimiert [212].

1.5 Monozyten und Hämostaseveränderungen bei Sepsis

Monozyten als mononukleare Phagozyten entfernen unter physiologischen Bedingungen gealterte insuffiziente Zellen aus dem Blutstrom. Bei einer Infektion nehmen sie körperfremde Strukturen auf, präsentieren Antigene, und setzen Entzündungsmediatoren frei.

Über die Bindung von Lipopolysacchariden an CD14, ein Oberflächenmolekül von Makrophagen und Neutrophilen, kann via TLR4 oder TLR2 über verschiedene Phosphorylierungskaskaden NFκB aktiviert werden. Nach nukleärer Translokation von NFκB werden entsprechende Gene aktiviert, um proinflammatorische Zytokine zu generieren. Die Bindung von LPS an CD14 wird durch LPS-binding-protein (LBP) gefördert [208].

Die hauptsächliche Signaltransduktion bei einem beginnenden Befall durch gramnegative Bakterien wird im Monozyten durch TLR-4 vermittelt. Die exakten Mechanismen sind noch nicht geklärt [197]. Auch Pilztoxine können mit TLR-4 interagieren und die Produktion proinflammatorischer Zytokine über NFκB induzieren. Toxine grampositiver Bakterien provozieren eher eine Signaltransduktion über TLR-2. NFκB wird dann in einer, der LPS-Stimulation ähnlichen Art und Weise, freigesetzt und aktiviert [101, 179].

Monozyten und Makrophagen setzen nach Aktivierung durch Pathogene insbesondere große Mengen TNFα, IL-1, IL-6, IL-8, PAF (platelet activating factor), ROS (reactive oxygen species) und NO (nitric oxide) frei und aktivieren so weitere Zellen zur Initiation der inflammatorischen Reaktion [36]. Bereits binnen einer Stunde nach Kontakt mit toxischen Konzentrationen (> 5 ng/ml) an LPS reduziert sich die Monozytenzahl im Blut um 30 % [168]. Auch Alveolarmakrophagen sterben nach LPS-Einwirkung [21]. In einer Studie von Giamarellos-Bourboulis et al. wurden allerdings scheinbar Überlebensvorteile von Sepsispatienten im Zusammenhang mit früher Apoptose von Monozyten gesehen [63]. Auch wenn die Mechanismen, die zur Apoptose der Monozyten führen, letztlich nicht geklärt sind, und die Studie von Giamarellos-Bourboulis et al. kontrovers diskutiert wird [119], konnte gezeigt werden, dass Entzündungsmediatoren und Sekretionsprodukte von Mikroorganismen die Vitalität von Monozyten verändern können [108, 109]. Die Freisetzung von tissue factor und Mikropartikel-TF durch Monozyten und somit auch die massive Wirkung der Monozyten auf die Hämostase wurde durch Mackman, Wada et al. und weitere Studiengruppen beschrieben [85, 105, 162, 173, 200]. Bei aktivierter Gerinnungskaskade und Thrombingeneration konnte die deutliche chemotaktische Potenz von Thrombin auf Monozyten und somit die Funktion von Thrombin als wichtiger physiologi-

scher Stimulator der inflammatorischen Antwort auf Gewebsverletzungen gezeigt werden [10].

Die von mehreren Studien beobachtete Reduktion der mononukleären Zellen im Zusammenhang mit Sepsis könnte im Sinne einer LPS-vermittelten toxischen Monozytendestruktion gewertet werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Parameter wie TF, Phospholipase A₂, sL-Selectin und sCD14 gemessen, um eine Aussage über eine eventuelle Monozytendestruktion zu erhalten.

CD14 ist ein Glycoprotein, welches sowohl in membrangebundener (mCD14) als auch in löslicher Form (sCD14) vorkommt [13]. Während das membrangebundene Protein vor allem auf Zellen der myeloiden Reihe, vor allem den Monozyten [213], exprimiert wird und hierbei einen Komplex mit dem TLR-2 bzw. TLR-4 bildet [211], existieren 2 lösliche Formen (55 bzw. 49 kDa), die entweder durch Kappung des Glycosylphosphatidyl-Inositol-Ankers oder aber durch proteolytische Spaltung mittels einer Serinprotease freigesetzt werden [27]. CD14 ist sowohl in membranständiger als auch in gelöster Form an der Initiation der Entzündungsreaktion durch eine Signalkaskade, welche durch Bindung von LPS entweder direkt an sCD14 oder aber als Komplex gebunden an das lipopolysaccharidbindende Protein (LBP) ausgelöst wird, beteiligt.

L-Selectin gehört mit anderen Selectinen, Integrinen und Mitgliedern der Immunoglobulin G Superfamilie zur Gruppe der Adhäsionsmoleküle. Abhängig vom Expressionsort werden E-, L- und P-Selectin unterschieden, wobei E-Selectin von Endothelzellen, L-Selectin von Leukozyten und P-Selectin sowohl von Endothelzellen als auch Thrombozyten exprimiert werden [16, 17, 30, 95, 160, 181]. Bei L-Selectin handelt es sich um ein glycosyliertes Protein mit einem Molekulargewicht zwischen 74 kDa (Lymphozyten) und 95 bis 105 kDa (Expression auf neutrophilen Granulozyten) [67, 182]. Zur Aufgabe der L-Selectine gehören sowohl die Initiation der ersten Endothelanhaftung, als auch das anschließende Rolling der Leukozyten auf der Zellmembran [50, 150]. Metalloproteasen spalten bei Entzündung die L-Selectine von der Zelloberfläche, die freigesetzten L-Selectine werden auch als soluble L-Selectine (sL-Selectine) bezeichnet. Bei gesunden Probanden konnten Plasmakonzentrationen von 1,6

+/- 0,8 µg/ml (MV+-SD) gemessen werden [153].

Arachidonsäuremetabolite oder Eicosanoide beteiligen sich als Lipidmediatoren sowohl an inflammatorischen als auch anderen Prozessen [57, 149]. Die Bildung von Prostaglandinen und Leukotrienen erfolgt über Cyclooxygenasen und Lipoxygenasen. Der limitierende Schritt der Eicosanoidbildung ist die Verfügbarkeit von Arachidonsäure. Phospholipase A₂ (PLA₂) hydrolysiert die Acyl-Ester-Bindung der Phospholipide in Biomembranen und setzt somit Lysophospholipide und freie Fettsäuren frei [121, 152]. Während Lysophospholipide Endothelzellen schädigen [151, 178, 210], erfolgt durch die Freisetzung von freien Fettsäuren/Arachidonsäure die Initiation des Cyclooxygenase- und Lipoxygenaseweges und somit die Produktion von proinflammatorischen Eicosanoiden, z.B. Prostaglandinen, Leukotrienen und Thromboxanen [71].

2. Material und Methoden

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universitätsklinik Marburg genehmigt (54/04) und das schriftliche Einverständnis des einzelnen Patienten wurde eingeholt. Es wurden Patienten mit nachgewiesener oder wahrscheinlicher systemischer Infektion in die Studie eingeschlossen. 48 von 62 Patienten benötigten eine maschinelle Beatmung für durchschnittlich 12,1 \pm 9,6 Tage (MV \pm 1 SD), eine Hypoxie trat nicht auf. Bei keinem der Studienpatienten mit schwerer Sepsis trat eine „overt DIC“ auf, d.h. kein Patient hatte eine schwere Verbrauchskoagulopathie mit Blutungskomplikationen.

2.1 Präanalytik

Es wurden Citratblut (0,5 ml 106 mM Natriumcitrat + 4,5 ml venöses Blut in Polypropylen-Monovetten; Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) und EDTA-Blut (1,6 mg K₃-ethylene diamine tetra acetate (EDTA)/ml in Polypropylen-Monovetten von Sarstedt) den Patienten entnommen und sofort bei 23 °C ins Labor transportiert. Der Plasmabestandteil des Blutes der Patienten (während eines Aufenthaltes auf der Intensivstation von bis zu 10 Tagen) wurde durch Zentrifugation bei 2800 g für 10 min bei 23 °C abgetrennt. Ein Teil des EDTA versetzten Plasmas wurde danach mit 2,5 M Arginin (pH 8,6) 1 + 1 versetzt, um es gegen Lagerungs-, Gefrier- und Auftauartefakte komplett zu stabilisieren. EDTA-Arginin-Plasma, EDTA-Plasma und Citratblut wurden zu 200 μ l, 100 μ l bzw. 500 μ l mehrfach aliquotiert und bei –80 °C bis zur jeweiligen Untersuchung gelagert.

In allen ELISA-Tests, die mit EDTA-Arginin-Plasma durchgeführt wurden, wurde das Antigen mit dem spezifischen Antikörper in Gegenwart von 500-625 mM Arginin (pH 8,7) inkubiert, da Arginin in dieser Konzentration die plasmatische Aktivierung der Hämostase komplett inhibiert [165, 166]. Dadurch konnte das Risiko für in vitro-Veränderungen der Proben vor oder während der ersten Inkubation minimiert werden. Die Mittelwerte der Normalwerte und deren Standardabweichung (MVn + 1 SD) wurden aus dem Plasma von 48 gesunden Medizinstudenten (Restblut, welches im Rahmen von Routineuntersuchungen angefallen war) ermittelt.

2.2 sCD14

Die lösliche Clusterdeterminante 14 (sCD14) wurde mit einem ELISA von R&D bestimmt. 100 µl Probenpuffer, 100 µl 1 M Arginin (pH 8,7) und 10 µl Arginin stabilisiertes EDTA-Plasma (pH 8,7) wurden mit immobilisierten monoklonalen Antikörpern gegen sCD14 für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Platten 4fach gewaschen und 200 µl sCD14-Konjugat (polyclonale sCD14-Antikörper gekoppelt an Meerrettichperoxidase) wurde zugegeben. Nach 1 Stunde (RT) wurden die Platten erneut 4fach gewaschen und 200 µl Substratlösung (Wasserstoffperoxid, Tetramethylbenzidin) zugesetzt. Der $\Delta A/\text{min}$ -Wert wurde bei 405 nm bestimmt. Nach 30 min wurden 50 µl 1 M Schwefelsäure zupipettiert und die Absorption bei 450 nm gemessen. Der normale Mittelwert \pm 1 SD lag bei 1,0 \pm 0,31 µg/ml.

2.3 sL-Selectin

Auch lösliches L-Selectin wurde mit einem ELISA der Firma R&D bestimmt. 100 µl Probenpuffer, 100 µl 1 M Arginin und 10 µl Arginin stabilisiertes EDTA-Plasma reagierten mit immobilisierten monoklonalen Antikörpern gegen lösliches L-Selectin. Nach 2 Stunden (bei Raumtemperatur) wurden 100 µl L-Selectin-Konjugat (polyclonale Schaf-Antikörper gegen rekombinantes humanes lösliches L-Selectin, gekoppelt an Meerrettichperoxidase), welches in 625 mM Arginin (pH 8,7) gelöst war, zugesetzt. Nach einer weiteren Stunde (RT) wurden die Mikrotiterplatten 4fach gewaschen. 100 µl stabilisierte Substratlösung (Tetramethylbenzidin) wurden zugegeben. Der $\Delta A/\text{min}$ -Wert wurde bei 405 nm bestimmt. Nach 30 min wurden 100 µl 0,5 N Schwefelsäure zugegeben und die Absorption bei 450 nm gemessen. Der normale Mittelwert \pm Standardabweichung (1 SD) betrug 1,33 \pm 0,27 µg/ml.

2.4 Phospholipase-A₂-Aktivität

Die Phospholipase-A₂-Aktivität wurde mit einem funktionellen Test (sPLA₂-Assay, R&D Systems) in Citratplasma gemessen. 2 µl Probe bzw. 0 - 160 U/ml Standardlösung wurden in Polystyrene U-Wells mit 20 µl Assay-Puffer und 5 µl

Hexadecylphosphocholin (einem künstlichen, unphysiologischen Substrat der Phospholipase A₂) für 30 min bei 37 Grad inkubiert. Danach wurden 4 µl Stopplösung und 4 µl Farbreagenz [5,5'-dithiobis(2-Nitrobenzoesäure) in Ethanol, Ellman's Reagenz] zugesetzt. Die Absorption wurde nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur und 405 nm gemessen. Der normale Mittelwert +/- 1 SD betrug 9,2 +/- 3,3 U/ml.

2.5 Tissue factor

Zur Analyse des tissue factors (TF) wurde ein ELISA eingesetzt (IMUBIND Tissue Factor, American Diagnostica, Stanford). 75 µl Probenpuffer und 75 µl Arginin stabilisiertes EDTA-Plasma oder Arginin-EDTA-stabilisierte Standards wurden mit immobilisierten monoclonalen Ratten-Antikörpern gegen humanes TF für 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Antikörper neutralisieren humanes Hirn-TF. Die Wells wurden anschließend 4fach mit Waschpuffer gewaschen. Danach wurden 100 µl Detektionsantikörper (biotiniliertes antihumanes TF-Antikörper-Fab-Fragment, welches gebundenen TF erkennt) zugegeben. Nach einer Stunde (RT) wurden die Platten erneut 4fach gewaschen und 100 µl Enzymkonjugat (Streptavidin-Meerrettichperoxidase) zugesetzt. Nach einer weiteren Stunde wurde letztmalig 4fach gewaschen. Nun wurden 100 µl Tetramethylbezidinsubstratlösung zugegeben. Es entwickelte sich eine Blaufärbung, deren Intensitätszunahme bei 405 nm verfolgt wurde. Nach 30 min bei Raumtemperatur wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 50 µl 0,5 N Schwefelsäure gestoppt und die Absorption bei 450 nm gemessen. Der normale Mittelwert +/- 1 Standardabweichung lag bei 140 +/- 42 pg/ml.

2.6 Thrombinaktivität

Die zirkulierende amidolytische Thrombinaktivität (Faktor IIa) wurde mit jeweils 100 µl Arginin-stabilisiertem EDTA-Plasma (1,25 M Arginin) bzw. Arginin-stabilisiertem 100 % Normalplasma (gepooltes normales EDTA-Plasma) nach Inkubation mit 20 µl 2 mM chromogenem Thrombinsubstrat HD-CHG-Ala-Arg-pNA (Pentapharm, Basel, Schweiz) in 1,25 M Arginin (pH 8,7) in Polystyren F-Wells (NUNC, Wiesbaden, Deutschland) gemessen [167]. Die basale Absorption und

die lineare $\Delta A/h$ wurde bei 37 °C gemessen und mit der Absorption des 100 % Standards (ca. 100 mA/2 h) verglichen. Der Mittelwert +/- 1 Standardabweichung betrug 100 +/- 20 %.

2.7 Fibrinogenantigen und Fibrinogenfunktion

Die Fibrinogenfunktion (FIFTA) und das Fibrinogenantigen (FIATA) wurden mittels neuer Mikrotiterplattenassays getestet. Dabei kamen jeweils 40 µl Citratplasma bzw. 20 µl Citratplasma zum Einsatz [169, 171]. Das FIFTA/FIATA-Verhältnis wurde berechnet (Mittelwert +/- Standardabweichung = 1,0 +/- 0,1). Ein Verhältnis größer 1,1 könnte auf das Vorhandensein von Fibrin hinweisen. Ein Wert unter 0,9 könnte das Vorhandensein von Dysfibrinogenen oder Fibrin-spaltprodukten anzeigen.

2.8 D-Dimere

Die Konzentration der D-Dimere wurde mittels ELISA (IMUCLONE, D-Dimer, American Diagnostica, Stanford, Connecticut, USA) bestimmt. 200 µl Probenpuffer, welcher 500 mM Arginin (pH 8,7) enthielt, und 10 µl EDTA-Arginin-Plasma oder EDTA-Arginin-Standards reagierten dabei mit einem immobilisierten monoklonalen Antikörper gegen humane D-Dimere für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Nach 4fachem Spülen der Wells wurden 200 µl eines monoklonalen Meerrettichperoxidase-konjugierten Antikörpers gegen humane D-Dimere zugegeben. Nach einer weiteren Stunde bei Raumtemperatur wurden die Wells erneut 4fach gewaschen. Nach Zugabe von 200 µl Tetramethylbenzidinsubstrat wurde $\Delta A/t$ bei Raumtemperatur und einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt. Die enzymatische Reaktion wurde nach 5 min durch 50 µl 0,45 M Schwefelsäure (H₂SO₄) gestoppt und die Absorption bei 450 nm gemessen. Der normale Mittelwert +/- 1 Standardabweichung betrug 0,049 +/- 0,025 µg/ml.

2.9 Antithrombin-III-Funktion

Die Antithrombin-III-Funktion (AT III) wurde am Behring Coagulation Timer (BCT) bestimmt (BERICHROM Antithrombin III; Dade Behring, Marburg, Germany): 1 µl Citratplasma wurde mit 60 µl Thrombinreagenz (Rinderthrombin, Heparin, Aprotinin, 100 mM Tris, 0,87 % NaCl, pH 8,2) für 3 Minuten bei 37 °C inkubiert. 10 µl Substratreagenz (4 mM Tosylglycyl-L-Prolyl-L-Arginyl-5-Amino-2-Nitrobenzoidsäure-Isopropylamid) wurden zugegeben und die Absorption bei 405 nm gemessen. Der normale Mittelwert +/- eine Standardabweichung des funktionalen AT III lag bei 100 +/- 15 %.

2.10 Protein-C-Funktion

Die Protein-C-Funktion (PC) wurde mittels BERICHROM Protein C (Dade Behring, Marburg, Germany) bestimmt. 2 µl Citratplasma oder 100 % der Norm gepooltes Plasma wurden mit 20 µl Protac® (Agkistrodon contortrix Giftextrakt) in 25 mM HEPES, pH 8,25, 2,5 g/l Polyethylenglycol, 30 mM (5 g/l) CsCl für 5 min bei 37 °C in U-wells (NUNC) inkubiert. 10 µl 2,5 M Arginin, pH 8,6 (781 mM finale Konzentration) und 5 µl 2,4 mM Pyro-Glu-Pro-Arg-Methoxynitroanilid (CS-PCa) (676 mM finale Konzentration an Arginin) wurden hinzugefügt und die lineare $\Delta A/t$ bei Raumtemperatur gemessen und mit der Absorption des 100 % Standards verglichen. Um die geringfügige basale Protein-C-Aktivität (PCa) im Citratplasma abzuziehen, wurde das Arginin-Reagenz vor den 20 µl physiologischer NaCl, welche das Protac® ersetzten, zugefügt. Nach Zugabe von Protac® anstatt NaCl konnte gezeigt werden, dass Protac® durch Arginin komplett gehemmt werden kann. Der normale Mittelwert +/- 1 Standardabweichung an funktionellem Protein C betrug 100 +/- 15 %.

2.11 LPS und β -Glucan

Freie Lipopolysaccharide und freies (1,3)-D- β -Glucan (Lipopolysaccharid- oder β -Glucanreaktivität) wurden funktionell mittels oxidativer Destruktion der Inhibitoren der *Limulus polyphemus* Kaskade bestimmt. Standard war gepooltes Citratplasma, welches entweder mit 0 - 1000 ng/ml Lipopolysacchariden (aus

Escherichia coli 055:B5, gereinigt durch Gel-Filtration, Proteingehalt < 3 %, Artikelnummer L 2637, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) oder mit 0 - 100 µg/ml Zymosan A (aus *Saccharomyces cerevisiae*, Artikelnummer Z 4250, Sigma [116]) versetzt wurde. 20 min nach der Endotoxinzugabe, die bei Raumtemperatur erfolgte, wurden 3,2 mg/ml EDTA zugefügt. Anschließend wurden jeweils 10 µl des Standardplasmas bzw. des EDTA-Plasmas der Patienten als Doppelansatz unter Zugabe von 5 µl 106 mM Natriumcitrat (pH 7,4) und 10 µl 60 mM Chloramin-T® (Sigma) in Mikrotiterplatten (F-wells, Polysorp, Artikelnummer 444160, NUNC, Wiesbaden, Deutschland) mit 0,9 % NaCl für 10 min bei 37 °C inkubiert. 10 µl 230 mM in Wasser gelöstes Methionin ohne (Lipopolysaccharid- und β-Glucanreaktivitäts-Assay) bzw. mit (β-Glucanreaktivitäts-Assay) 0,63 mg/ml Polymyxin B (Sigma-Fluka) wurden zugegeben. Nach dreiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 30 µl Limulus Amebocyten Lysat Reagenz, welches die Limulus Faktoren C, B und A sowie das chromogene Substrat für den aktivierten Faktor A Ile-Glu-Gly-Arg-pNA (Coamatic-Chromo-LAL, Chromogenix, Mölndal, Schweden) enthielt, zugesetzt. Dieses Co-Lyophilisat wurde in 3,2 ml 200 mM Tris-Puffer (pH 8,0) gelöst. Danach erfolgte der hyperbolic-rate-Assay über 0 - 120 min bei Raumtemperatur. Der Extinktionsanstieg bei 405 nm wurde mit einem Mikrotiterplattenphotometer (Milenia, DPC, Los Angeles, Kalifornien, USA) mit einer Auflösung von 1 mA bestimmt. Nach durchschnittlich 90 min erreichte der Lipopolysaccharid-Reaktivitäts-Standard mit einer Konzentration von 11 ng/ml (gepooltes Normalplasma mit einer Lipopolysaccharid-Reaktivität von 1,0 ng/ml versetzt mit Lipopolysacchariden der Konzentration 10 ng/ml) einen Absorptionsanstieg (ΔA) auf circa 200 mA. Es wurden nur ΔA Werte in der Reaktionsphase, d.h. ohne vollständigen Verbrauch des chromogenen Substrates gewertet [d.h. bis zu 45 % des maximalen ΔA (circa 1000 mA)]. Die Zugabe von 10 µl 0,63 mg/ml Polymyxin B inhibierte vollständig bis zu 1000 ng Lipopolysaccharide, welche zu 1 ml gepooltem Normalplasma gegeben worden waren. Nach entsprechender Kalibrierung zeigte sich, dass gepooltes EDTA-Normalplasma eine Lipopolysaccharid-Reaktivität von 0,8 ng/ml aufwies. Der Normalbereich betrug 0,8 +/- 0,2 ng/ml (MV+/- 1SD) [170].

2.12 Präzision der Analysen

Die Präzision der angewandten Tests wurde durch 10fache Messung von gepooltem Normalplasma (100 % Standard) sowie mit 200%igen und 50%igen Standardlösungen ermittelt. Die intra-Assay Variationskoeffizienten wurden wie folgt berechnet: Variationskoeffizient = $100 \times \text{SD}/\text{MVn}$ (%). Die Untersuchungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt. Alle funktionellen Assays hatten intra-Assay Variationskoeffizienten kleiner 5 %, die Antigen-Assays wiesen intra-Assay Variationskoeffizienten kleiner 10 % auf.

2.13 Statistik

Die aus den Patientenproben gemessenen Mittelwerte (MVp) wurden mit den Mittelwerten des Normalplasmas (MVn) nach der Formel $(\text{MVp} - \text{MVn})/\text{SDn}$ verglichen. Parameter mit einem Quotienten, dessen Betrag $> 3,5$ war, wurden als mögliche Marker einer veränderten Hämostase angesehen.

3. Ergebnisse

Die gemessenen Werte zeigen, dass die plasmatische Hämostase bei Sepsispatienten alteriert ist. Die Koagulation wird aktiviert, und die Fibrinolyse ist inhibiert.

Tabelle 1a gibt die allgemeinen Hämostaseparameter der Patienten wieder. In Tabelle 1b ist der Betrag des Quotienten $(MV_p - MV_n)/SD$ mindestens 3,5, d. h. die pathologischen Mittelwerte überschreiten die Mittelwerte der Normalstandards um mehrere Standardabweichungen ($p < 0,05$). Die durchgeführten Tests erlauben es damit, pathologische von normalen Blutproben zu unterscheiden. Tabelle 1c zeigt die Testergebnisse, bei denen der Betrag von $(MV_p - MV_n)/SD$ unter 3,5 lag. Bei diesen Analysemethoden ist die Unterscheidung zwischen normalen und pathologischen Proben schwierig, und es fehlen klare Trennwerte. Die plasmatische Endotoxin-Reaktivität korrelierte mit Laktat ($r = 0,605$).

Die untersuchten $n = 62$ Patienten hatten zu Beginn ihrer Versorgung auf der Intensivstation 14600 ± 8200 ($MV \pm 1 SD$) Leukozyten/ μl , 11400 ± 6600 polymorphkernige Granulozyten/ μl , 1228 ± 1354 Lymphozyten/ μl , 715 ± 634 Monozyten/ μl und 187000 ± 117000 ($MV \pm SD$) Thrombozyten/ μl Blut.

Tab. 1a: Allgemeine Hämostaseparameter der 62 Sepsispatienten bei Beginn der intensivmedizinischen Therapie

Parameter	Normalwert $MV \pm 1 SD$	Normalwert [% der Norm]	Septische Patienten $MV \pm 1 SD$	Septische Patienten [% der Norm]
Hämatologie				
Thrombozyten	250 000 $\pm 50\,000/\mu l$	100 ± 20	187 000 $\pm 117\,000/\mu l$	75 ± 47
Leukozyten	7 150 $\pm 1\,430/\mu l$	100 ± 20	14 600 $\pm 8\,200/\mu l$	204 ± 115
Granulozyten	4 250 $\pm 1\,100/\mu l$	100 ± 26	11 400 $\pm 6\,600/\mu l$	268 ± 155
Lymphozyten	2 300 $\pm 500/\mu l$	100 ± 22	1 228 $\pm 1\,354/\mu l$	53 ± 59
Monozyten	364 $\pm 178/\mu l$	100 ± 49	715 $\pm 634/\mu l$	196 ± 174

Tab. 1b: Spezielle Hämostaseparameter bei 62 Sepsispatienten mit $|(MVp-MVn)/SDn| > 3,5$

Parameter	Normal- werte MV \pm 1 SD	Normal- werte [% der Norm]	Patienten mit klinischer Diagnose Sepsis MV \pm 1 SD	Patienten mit klinischer Diagnose Sepsis [% der Norm]	$ (MVp-MVn)/SDn $
Fibrinogenfunktion		100 \pm 20		188 \pm 66	4.4
Fibrinogenantigen		100 \pm 20		179 \pm 66	4.0
Thrombinaktivität	5.5 \pm 1.1 mIU/ml	100 \pm 20	9.5 \pm 3.4 mIU/ml	173 \pm 62	3.7
AT-III-Aktivität		100 \pm 15		36,4 \pm 19,3	4.2
D-Dimer- Konzentration	0.049 \pm 0.025 μ g /ml	100 \pm 40	3.98 \pm 3.59 μ g/ml	8122 \pm 7327	201
sL-Selectin- Konzentration	1.33 \pm 0.27 μ g/ml	100 \pm 20	4.0 \pm 5.6 μ g/ml	301 \pm 421	10.1
TF-Konzentration	140 \pm 42 pg/ml	100 \pm 30	568 \pm 225 pg/ml	406 \pm 161	10.2
LPS-Reaktivität	0.8 \pm 0.2 ng/ml	100 \pm 25	20.5 \pm 19.6 ng/ml	2563 \pm 2450	99
β -Glucan-Reaktivität	< 0.1 μ g/ml		4.7 \pm 7.0 μ g/ml		> 50
Endotoxin- Reaktivität	0.8 \pm 0.2 ng/ml	100 \pm 25	36.2 \pm 6.3 ng/ml	4525 \pm 3288	177

Tab. 1c: Spezielle Hämostaseparameter bei 62 Sepsispatienten mit $|(MVp-MVn)/SDn| < 3,5$

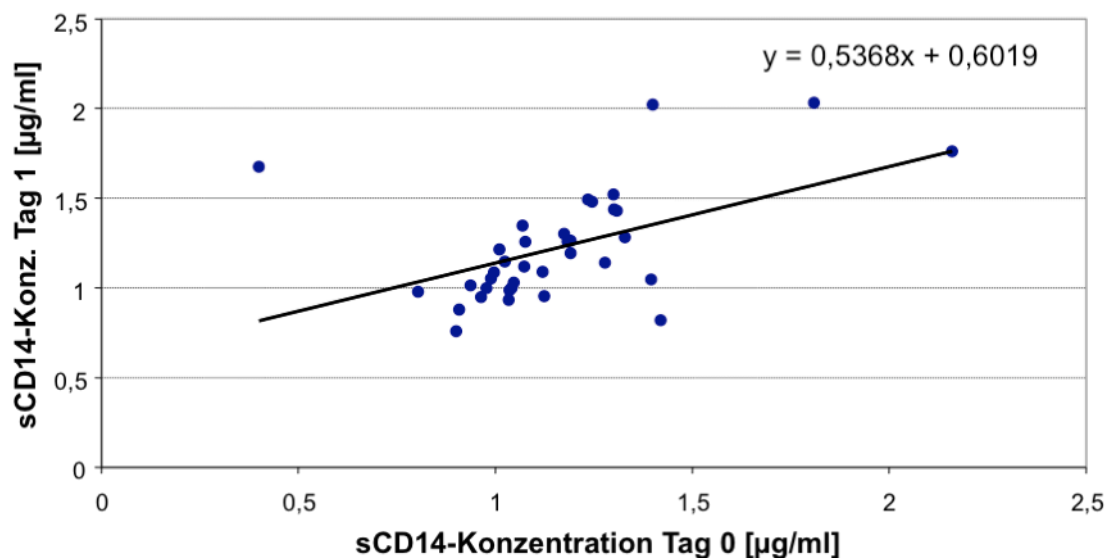
Parameter	Normal- wert MV \pm 1 SD	Normal- wert [% der Norm]	Patienten mit klinischer Diagnose Sepsis MV \pm 1 SD	Patienten mit klinischer Diagnose Sepsis [% der Norm]	$ (MVp-MVn)/SDn $
Protein-C-Aktivität		100 \pm 15		63 \pm 24	2.4
PLA ₂ -Aktivität	9.2 \pm 3.3 U/ml	100 \pm 36	12.7 \pm 5.9 U/ml	138 \pm 64	1.1
sCD14- Konzentration	1.0 \pm 0.31 μ g/ml	100 \pm 31	1.15 \pm 0.29 μ g/ml	115 \pm 29	0.5

3.1 sCD14

sCD14 lag bei Aufnahme auf der Intensivstation bei $1.15 \pm 0.29 \mu\text{g/ml}$ und bei $1.22 \pm 0.31 \mu\text{g/ml}$ nach einem Tag ($n = 36$ Patienten). Der gesunde Kontrollwert lag bei $1.0 \pm 0.31 \mu\text{g/ml}$ (Abb. 3).

Abb. 3: sCD14-Konzentration an Tag 0 und Tag 1

$r = 0,502$; 100 % der Norm = $1,0 \mu\text{g/ml}$

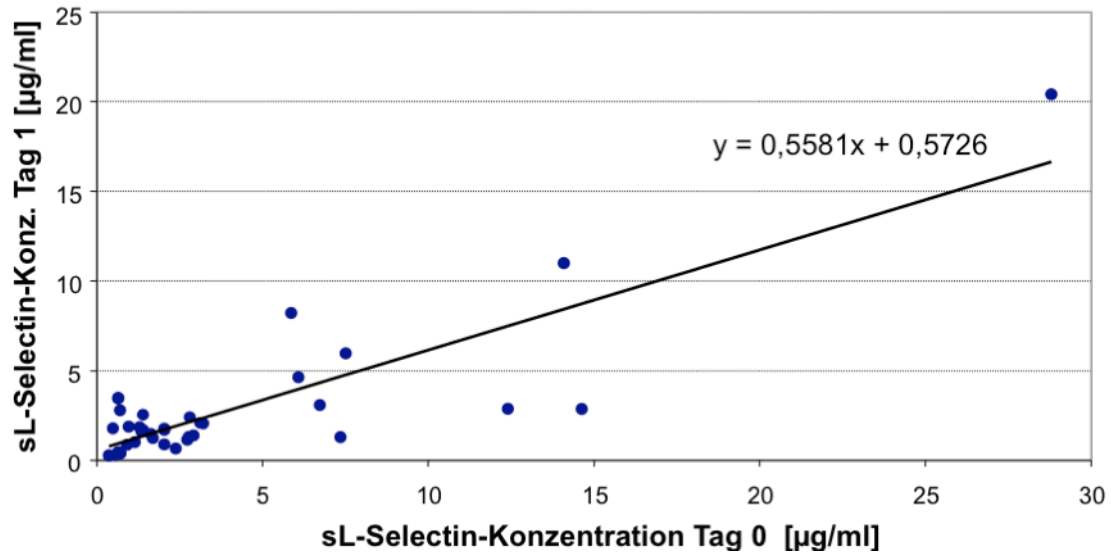


3.2 sL-Selectin

Abb. 4 zeigt das bei Aufnahme und an Tag 1 bestimmte soluble L-Selectin (sL-Selectin) ($n = 37$): $4.0 \pm 5.6 \mu\text{g/ml}$ (Tag 0) und $2.79 \pm 3.68 \mu\text{g/ml}$ (Tag 1). Der Normalbereich betrug $1.33 \pm 0.27 \mu\text{g/ml}$.

Abb. 4: sL-Selectin-Konzentration an Tag 0 und Tag 1

$r = 0,849$; 100 % der Norm = $1,33 \mu\text{g/ml}$



3.3 Phospholipase A₂

Abb. 5a demonstriert die Phospholipase A₂-Aktivität gegenüber einem synthetischen Substrat bei $n = 44$ Patienten. Die Patienten zeigten an Tag 0 Werte von $12,7 \pm 5,9$ U/ml und an Tag 1 Werte von $15,3 \pm 8,1$ U/ml (Normalbereich: $9,2 \pm 3,3$ U/ml). Der PLA₂-Verlauf von 8 Patienten während der 10 Tage auf der Intensivstation ist in Abb. 5b dargestellt.

Abb. 5a: PLA₂-Aktivität an Tag 0 und Tag 1

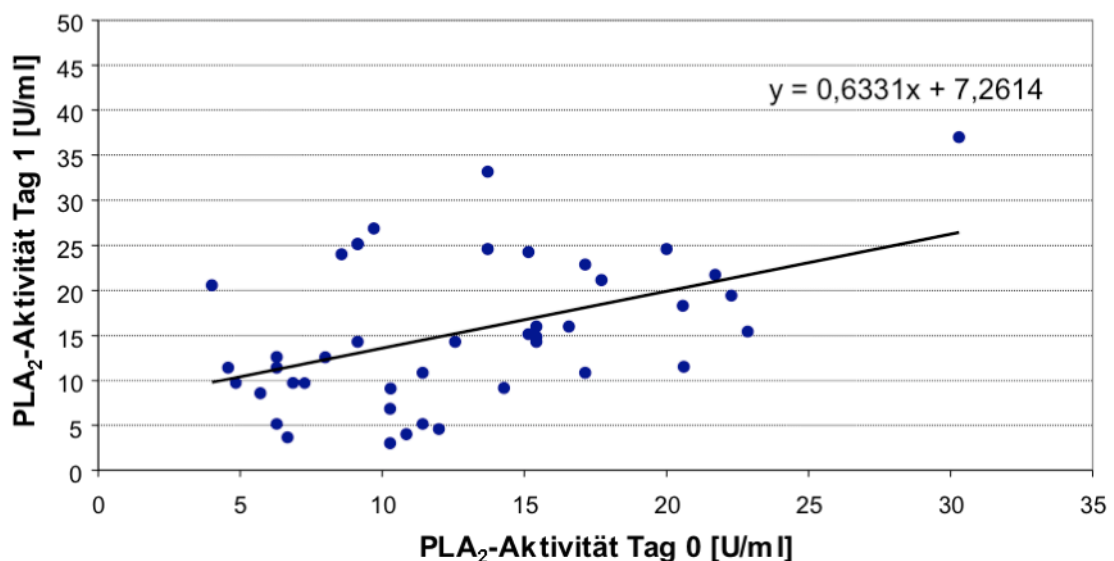
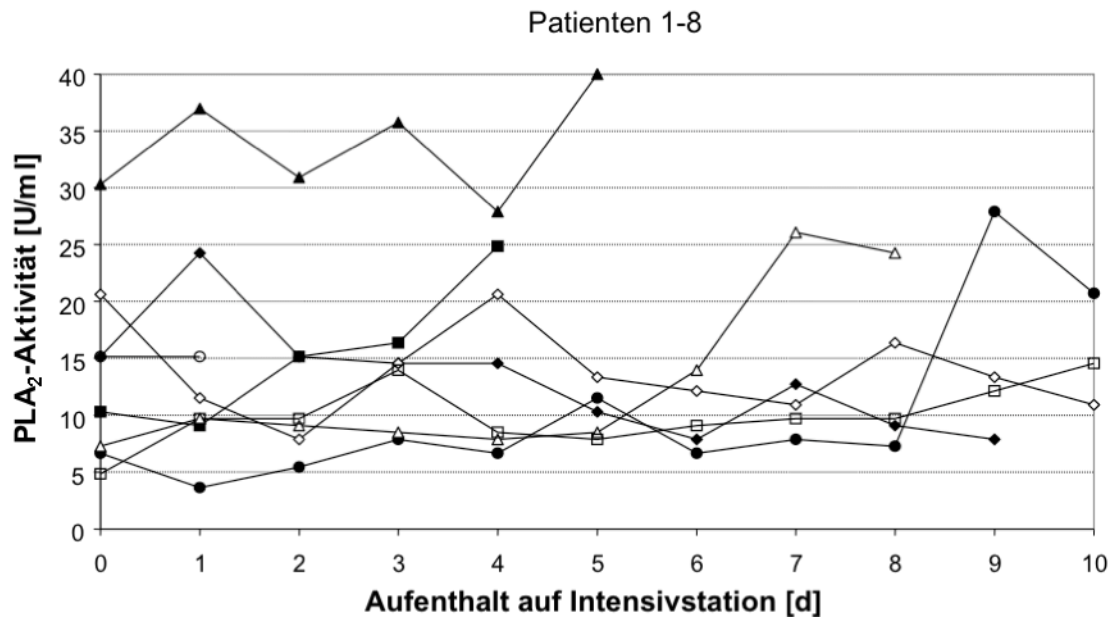


Abb. 5b: PLA₂-Aktivität, Verlauf über 10 Tage

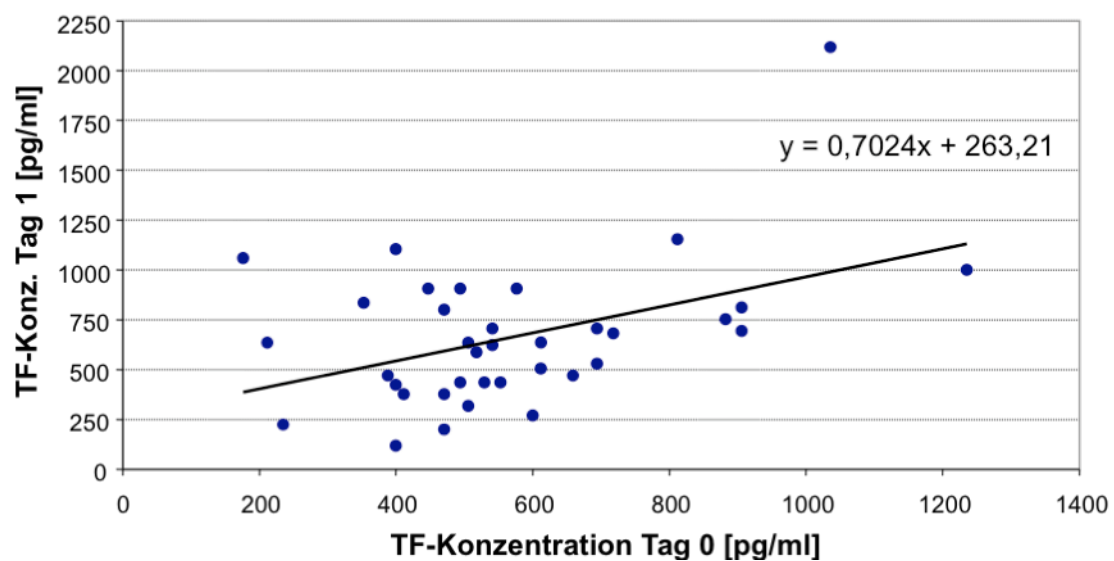


3.4 Tissue factor

Abbildung 6 stellt die tissue-factor-Antigen-Konzentration von n = 36 Patienten dar. TF wurde an Tag 0 mit 568 ± 225 pg/ml und an Tag 1 mit 662 ± 362 pg/ml bestimmt (Normalbereich: 140 ± 42 pg/ml).

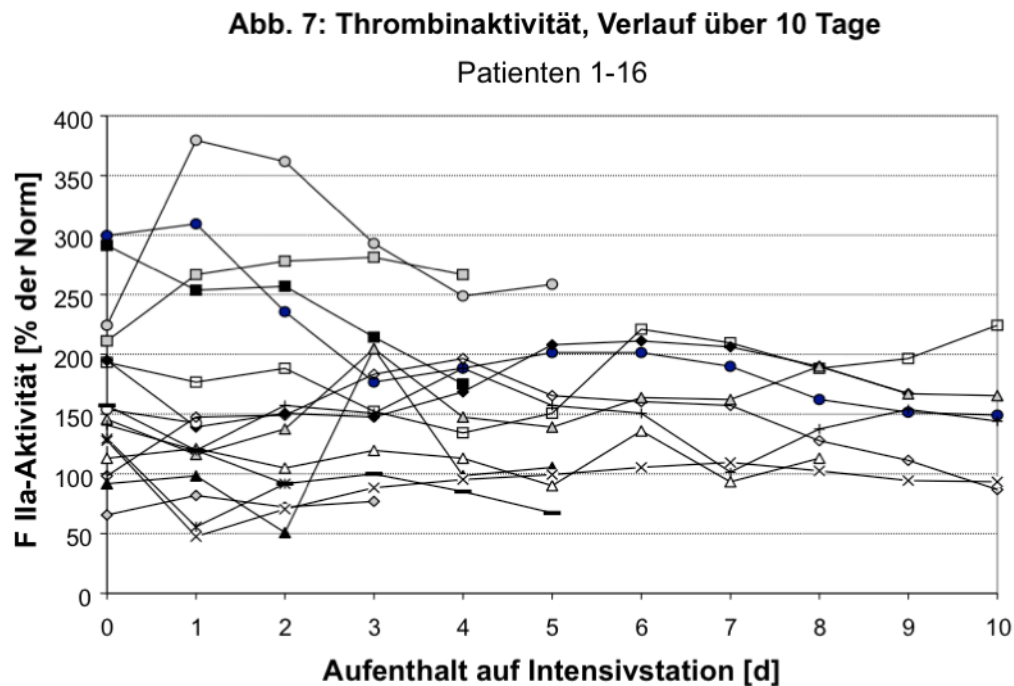
Abb. 6: TF-Konzentration an Tag 0 und Tag 1

$r = 0,437$; 100 % der Norm = 140 pg/ml



3.5 Zirkulierende amidolytische Thrombinaktivität

Abb. 7 zeigt den Verlauf der zirkulierenden amidolytischen Thrombinaktivität von n = 16 untersuchten septischen Patienten. Die Faktor IIa-Aktivität betrug an Tag 0 und Tag 1 ca. 170 ± 70 % der Norm (Normalbereich: 100 ± 20 %).



3.6 Fibrinogen Antigen und Fibrinogenfunktion

In den Abb. 8 a - d wurde bei n = 62 Patienten die Fibrinogenfunktion mittels FIFTA, eines neuen Tests, der auf einer physiologischen finalen Thrombinaktivität von nur 0.2 IU/ml basiert, gemessen. Durch diesen Test konnten an Tag 0 FIFTA-Werte von 188 ± 66 % der Norm (MV \pm SD), an Tag 1 FIFTA-Werte von 190 ± 67 % der Norm bestimmt werden. Jeder Patient wurde durch ein individuelles Symbol gekennzeichnet; die Normalwerte betrugen 100 ± 20 %.

Abb. 8a: FIFTA, Verlauf über 10 Tage

Patienten 1-16

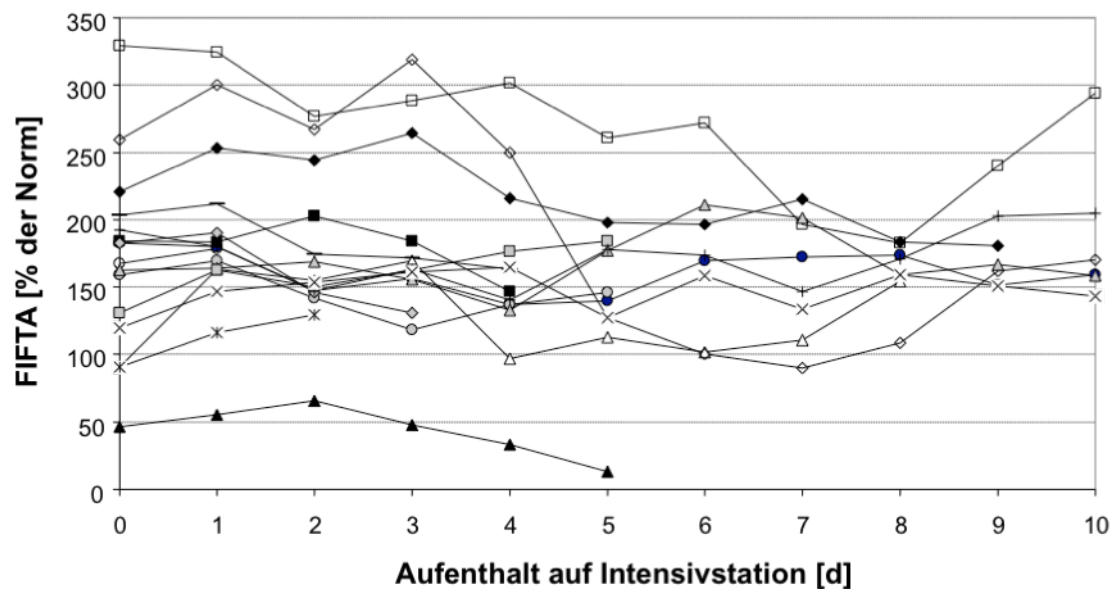


Abb. 8b: FIFTA, Verlauf über 10 Tage

Patienten 17-32

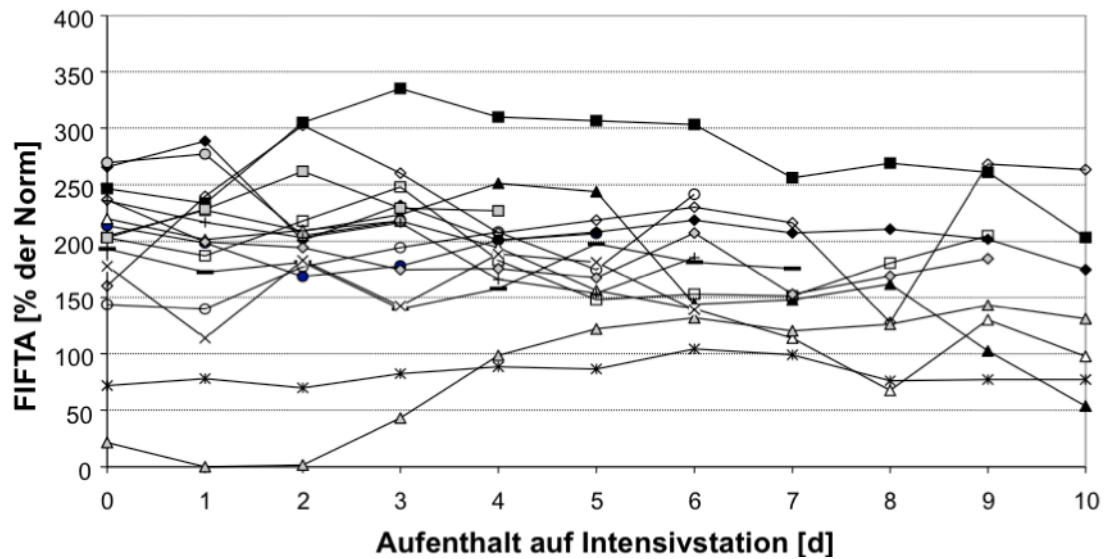


Abb. 8c: FIFTA, Verlauf über 10 Tage

Patienten 33-48

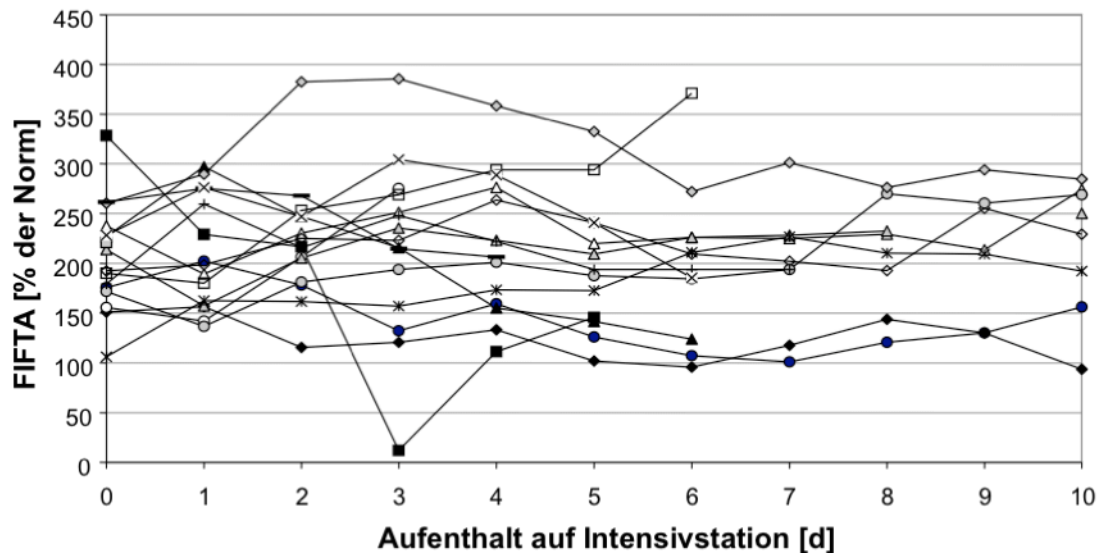
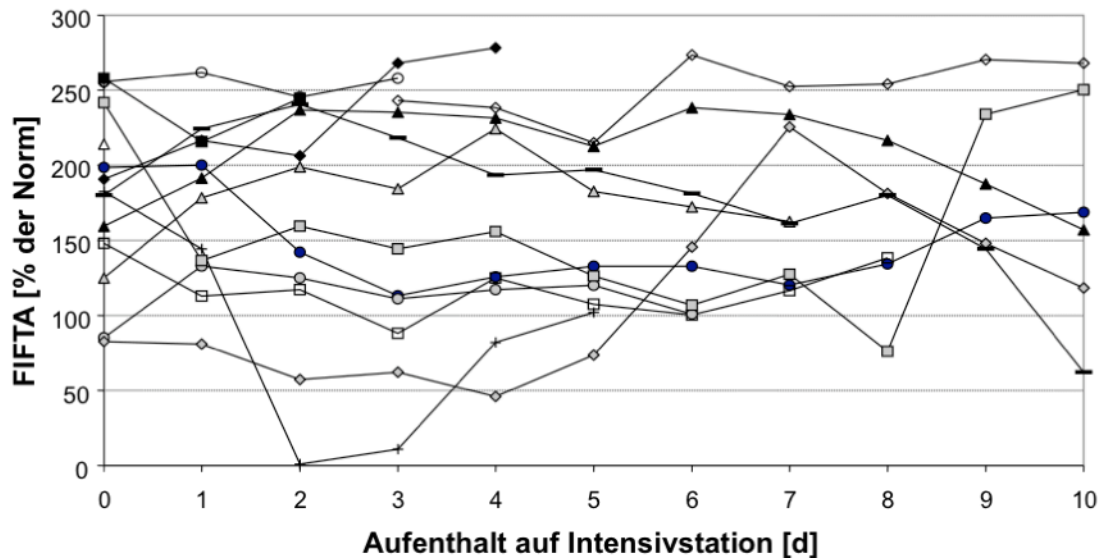


Abb. 8d: FIFTA, Verlauf über 10 Tage

Patienten 49-62



Fibrinogen wurde auch mittels des FIATA, eines Tests, der auf Vancomycin-Präzipitation von Fibrinogen-Antigen basiert, gemessen. Abb. 9 a - d stellt das bei n = 62 Patienten gemessene Fibrinogen-Antigen dar. Mittels FIATA konnten so an Tag 0 Werte von 179 ± 66 % der Norm (MV \pm SD) und an Tag 1 Werte von 183 ± 64 % der Norm nachgewiesen werden. FIFTA und FIATA korrelierten in n=505 Proben (184 ± 64 % FIFTA; 162 ± 53 % FIATA) mit $r = 0.496$ (Abb. 9e), d.h. beide Tests sind notwendig, ein Test kann den anderen nicht ersetzen.

Abb. 9a: FIATA, Verlauf über 10 Tage

Patienten 1-16

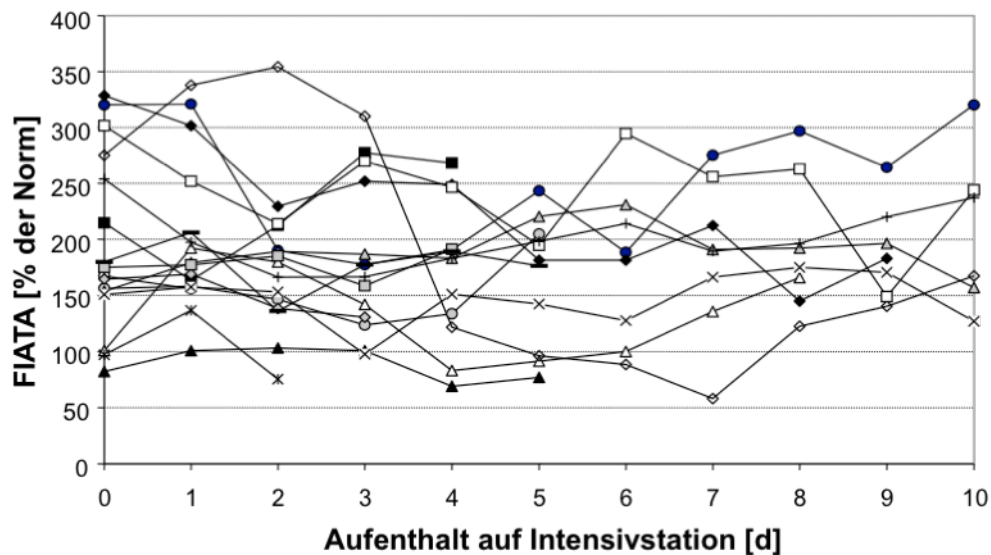


Abb. 9b: FIATA, Verlauf über 10 Tage
Patienten 17-32

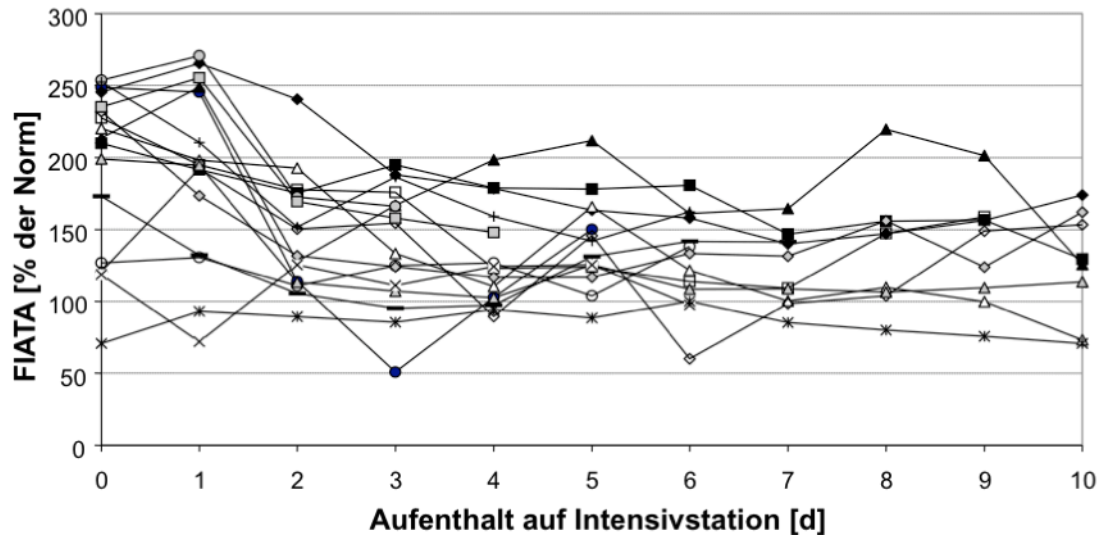


Abb. 9c: FIATA, Verlauf über 10 Tage
Patienten 33-48

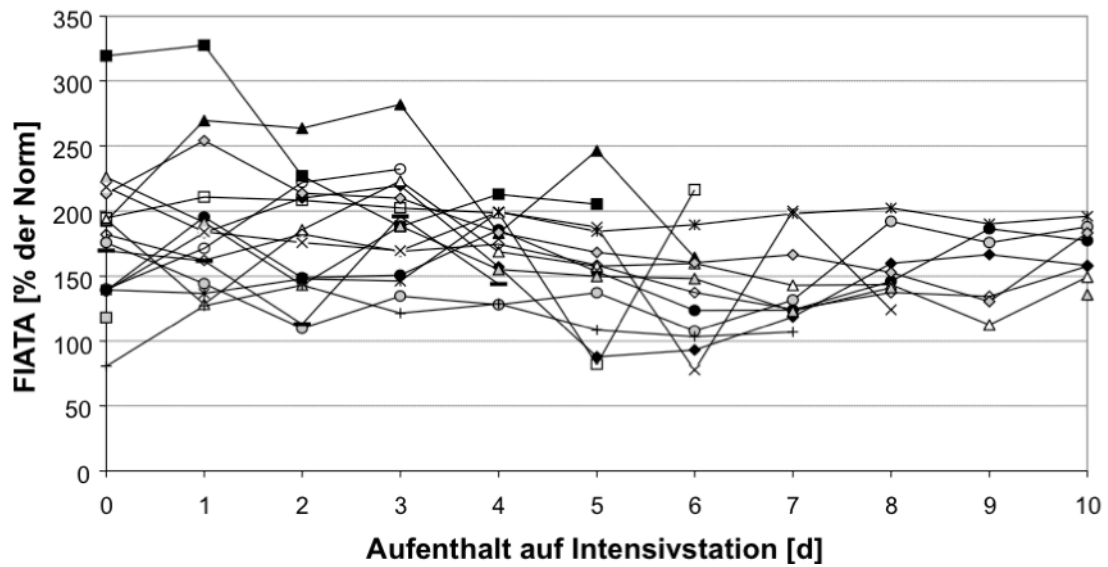


Abb. 9d: FIATA, Verlauf über 10 Tage

Patienten 49-62

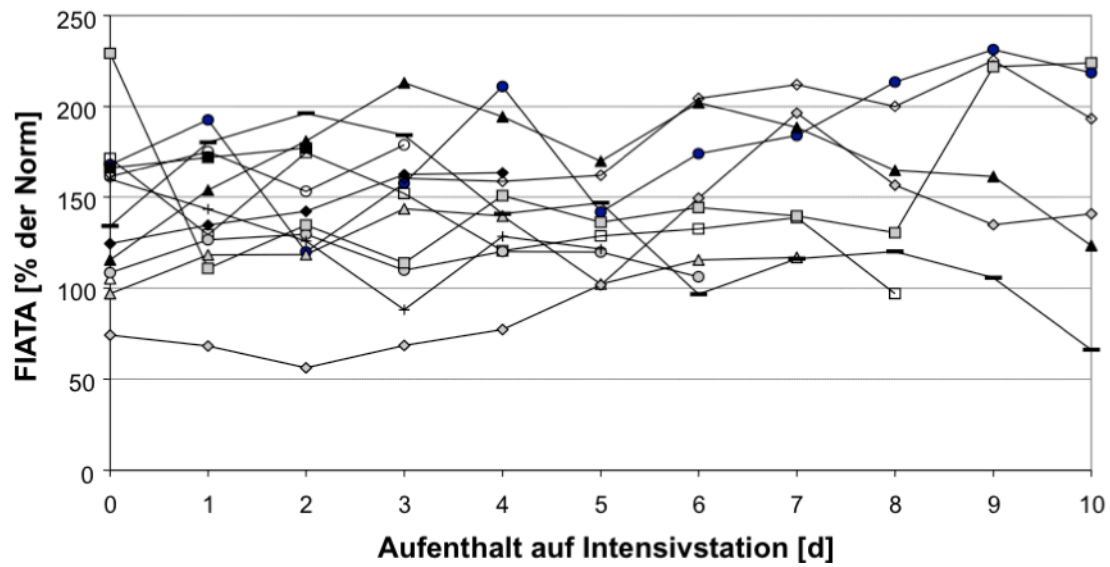
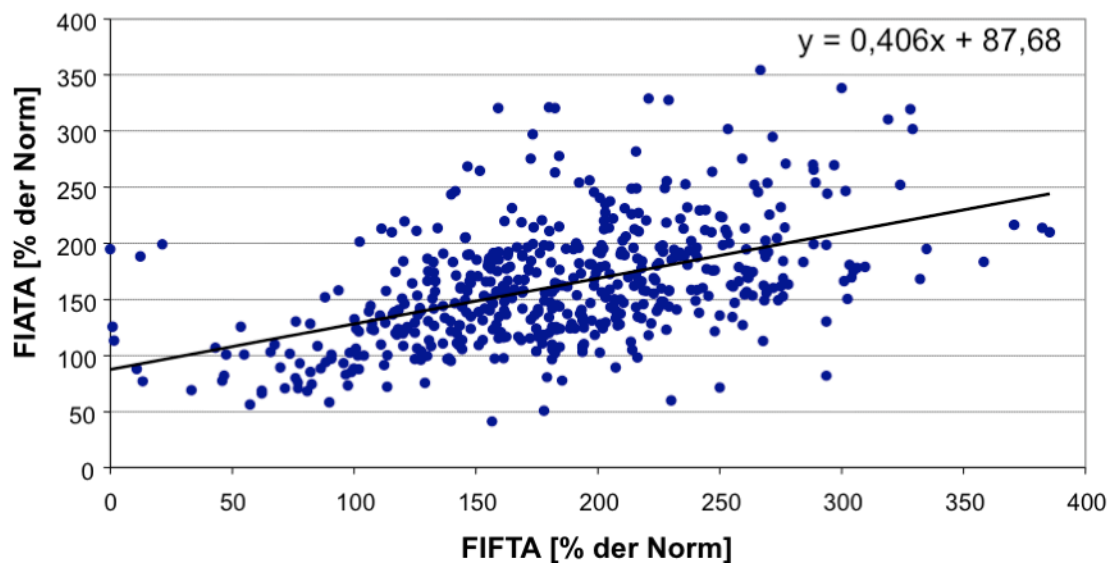


Abb. 9e: FIFTA/FIATA Korrelation

$r = 0,496$, $n = 505$



Die Abbildungen 10 a - d zeigen das Verhältnis von Fibrinogenfunktion und Fibrinogenantigen bei 62 Patienten während der ersten 10 Tage auf der Intensivstation. Das normale FIFTA/FIATA Verhältnis beträgt 1.0 ± 0.1 (Mittelwert \pm Standardabweichung). Die Patienten wiesen ein FIFTA/FIATA Verhältnis an Tag 0 von 1.12 ± 0.32 , an Tag 1 von 1.16 ± 0.58 auf. Eine Zunahme dieses Quotienten kann auf eine überproportional erhöhte Fibrinogenfunktion hinweisen, z. B. durch lösliches Fibrin – ein „Kristallisationspunkt“ für die Polymerisation weiterer Fibrinmoleküle. Ein niedriges Verhältnis kann eine überproportional herabgesetzte Fibrinogenfunktion anzeigen, zum Beispiel durch Fibrinogenspaltprodukte oder Dysfibrinogene.

Abb. 10a: FIFTA/FIATA Ratio, Verlauf über 10 Tage
Patienten 1-17

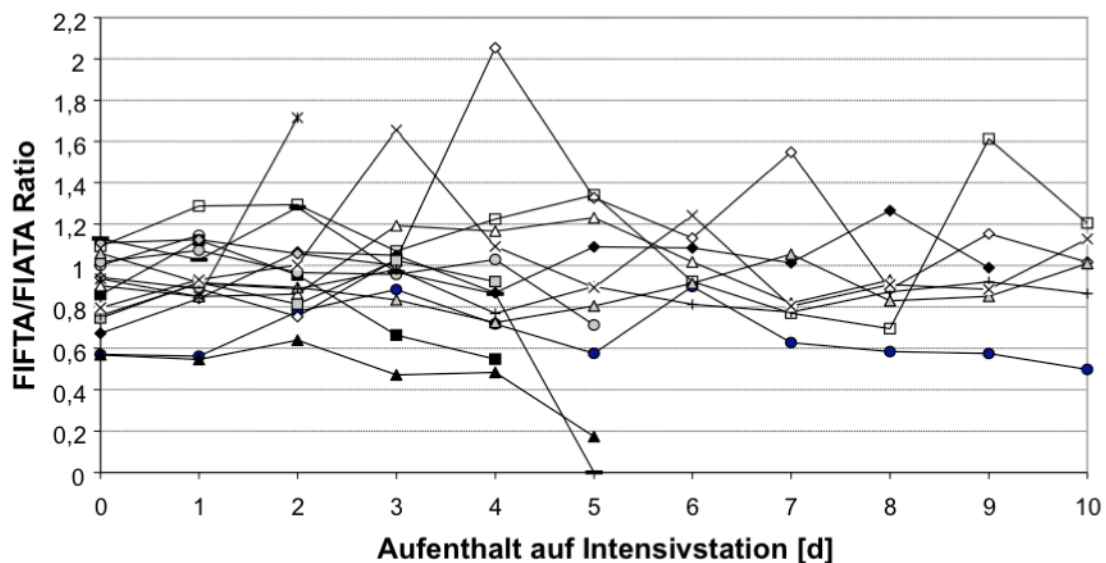


Abb. 10b: FIFTA/FIATA Ratio, Verlauf über 10 Tage

Patienten 17-32

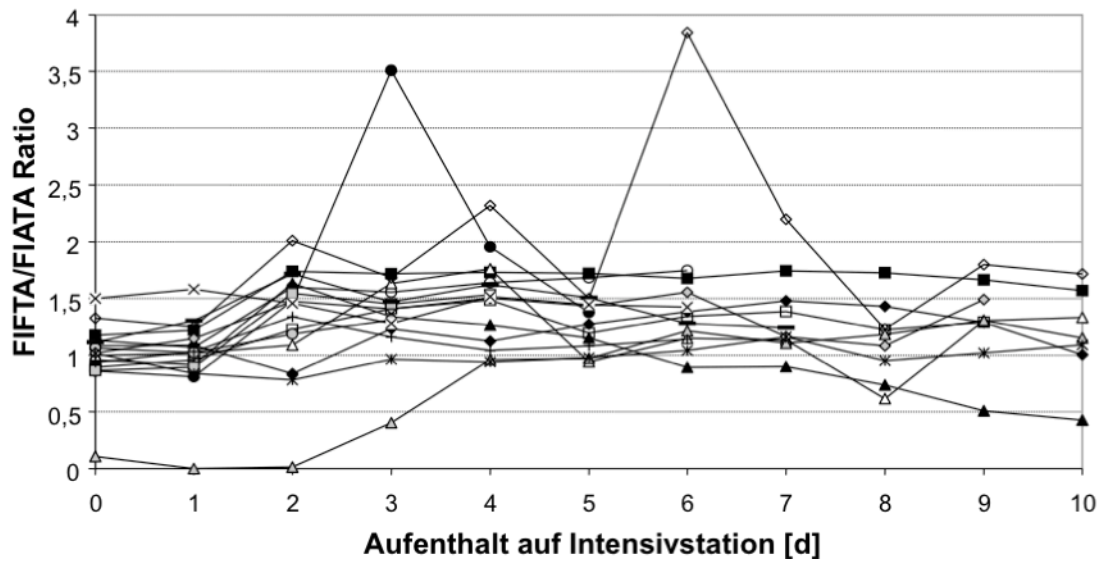


Abb. 10c: FIFTA/FIATA Ratio, Verlauf über 10 Tage

Patienten 33-48

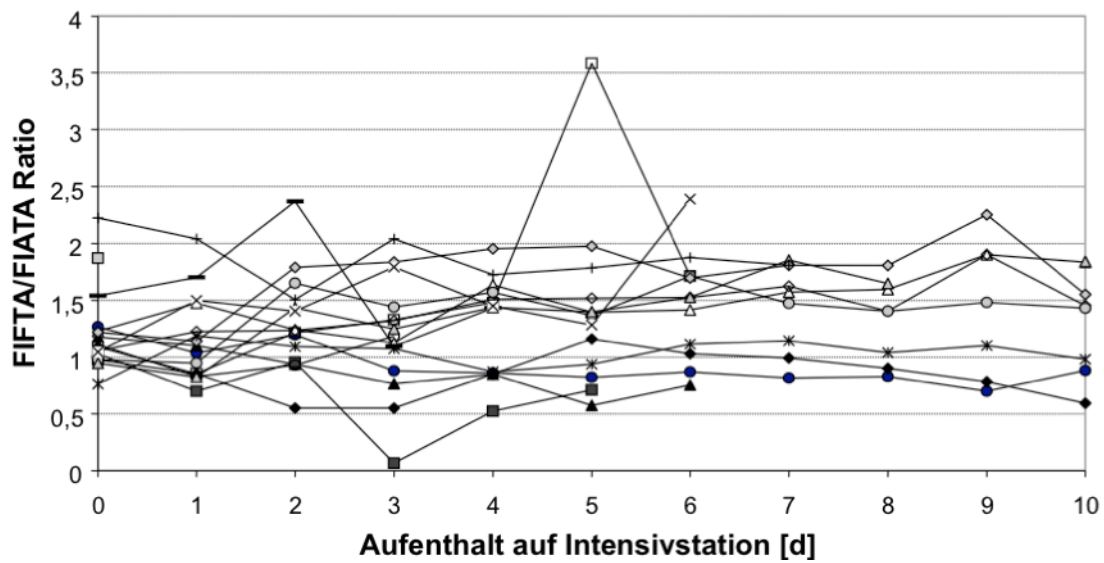
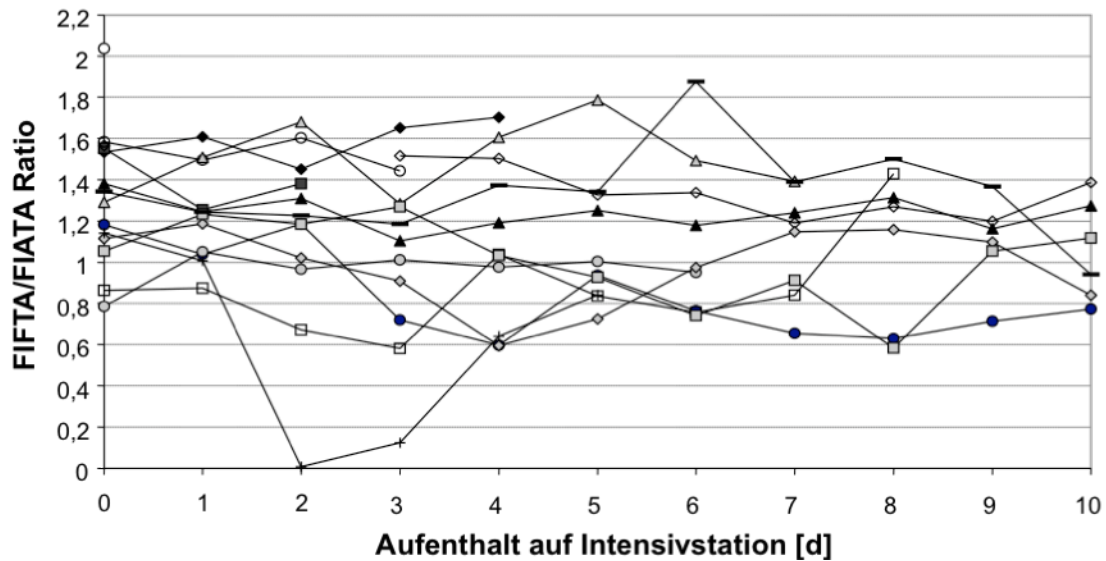


Abb. 10d: FIFTA/FIATA Ratio, Verlauf über 10 Tage

Patienten 49-62

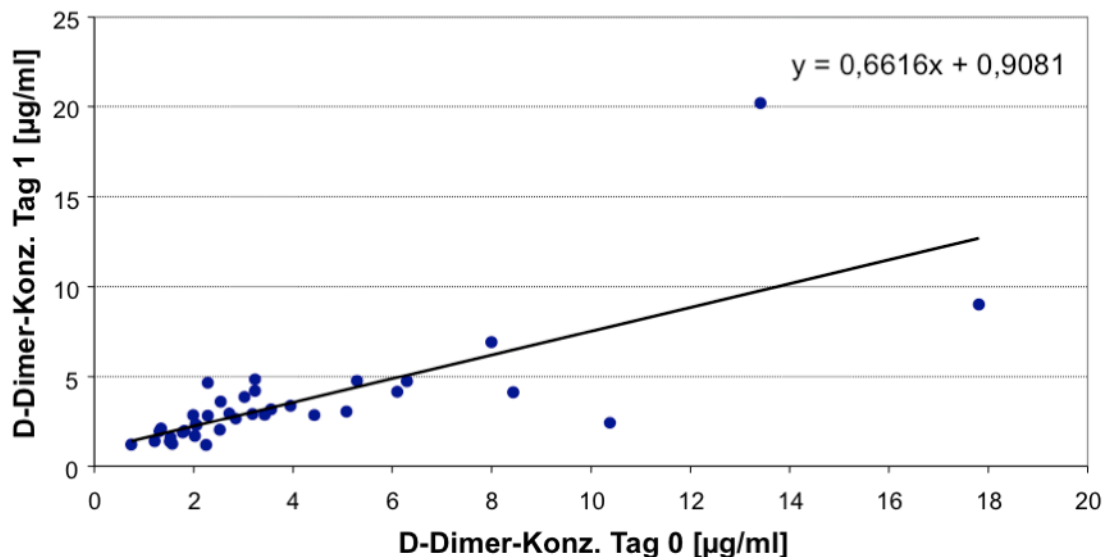


3.7 D-Dimere

Die D-Dimer-Konzentration von $n = 37$ Patienten wurde bei Aufnahme auf der Intensivstation $3.98 \pm 3.59 \mu\text{g/ml}$ und an Tag 1 ihres Aufenthalts $3.54 \pm 3.24 \mu\text{g/ml}$ bestimmt (Abb. 11). Der Normalbereich lag bei: $0.049 \pm 0.025 \mu\text{g/ml}$.

Abb. 11: D-Dimer-Konzentration an Tag 0 und Tag 1

$r = 0,732$; 100 % der Norm = $0,049 \mu\text{g/ml}$



3.8 Antithrombin III

Von n = 62 Patienten wurde die Antithrombin-III-Funktion gemessen (Abbildung 12 a - d). An Tag 0 lag diese bei $36,4 \pm 19,3$ % der Norm. An Tag 1 wurde eine AT-III-Funktion von $44,1 \pm 22,4$ % der Norm gemessen. Der Normalwert betrug 100 ± 15 %.

Abb. 12a: AT-III-Aktivität, Verlauf über 10 Tage
Patienten 1-16

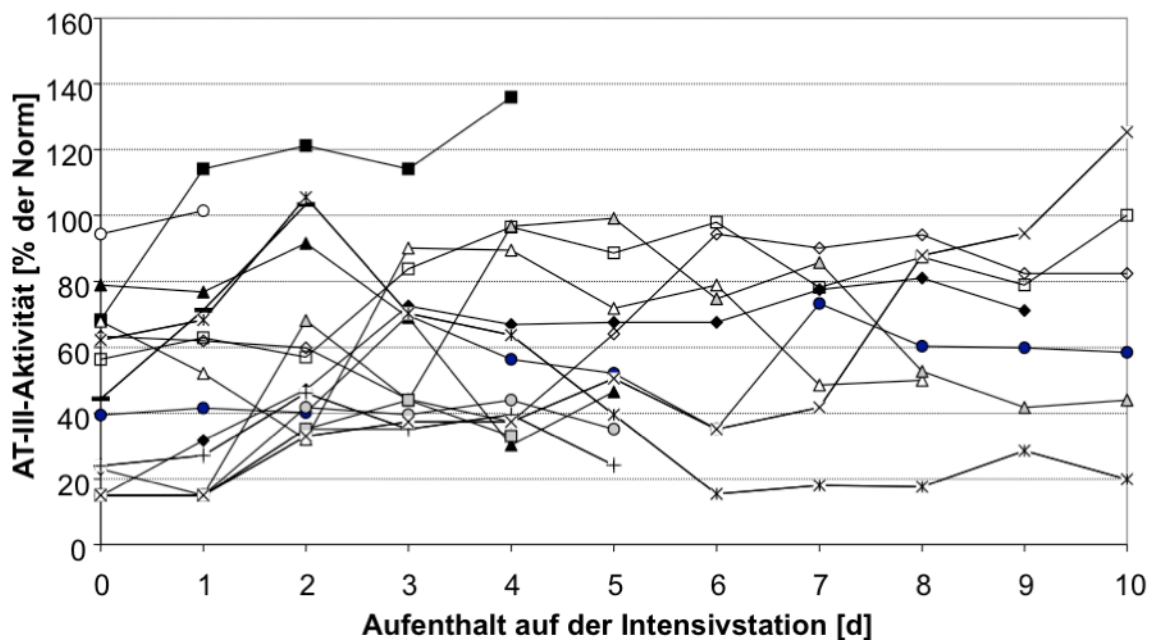


Abb. 12b: AT-III-Aktivität, Verlauf über 10 Tage

Patienten 17-32

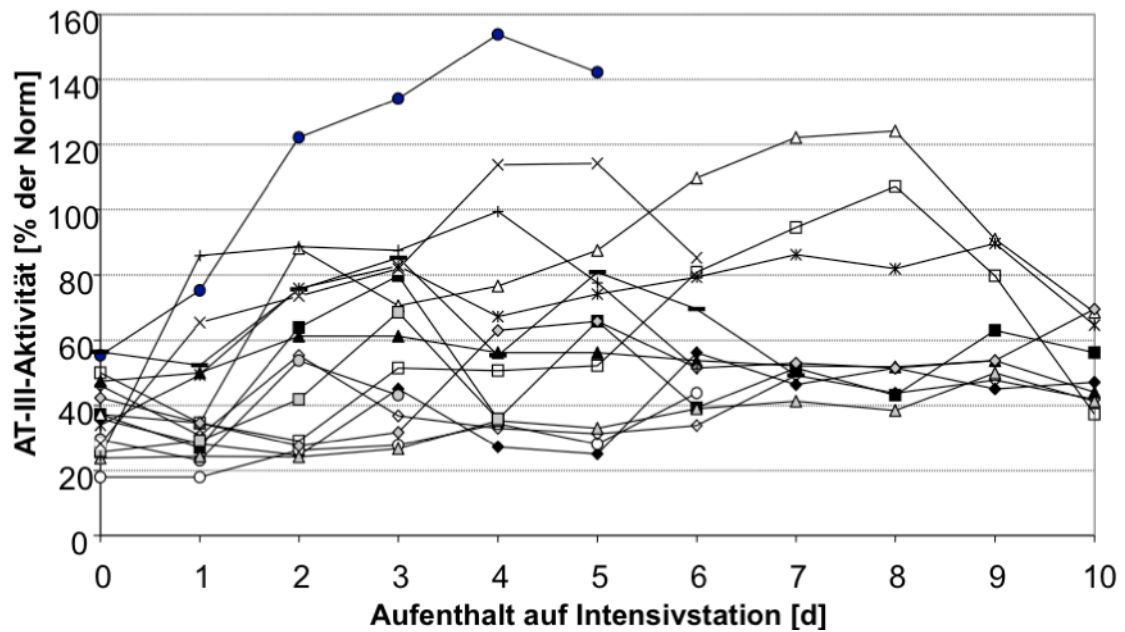


Abb. 12c: AT-III-Aktivität, Verlauf über 10 Tage

Patienten 33-48

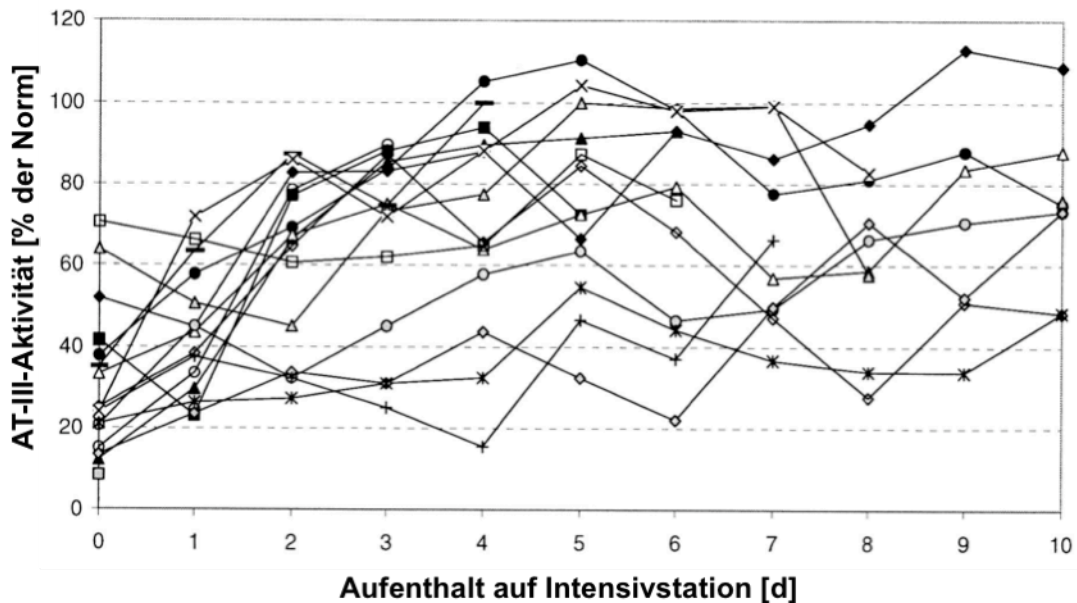
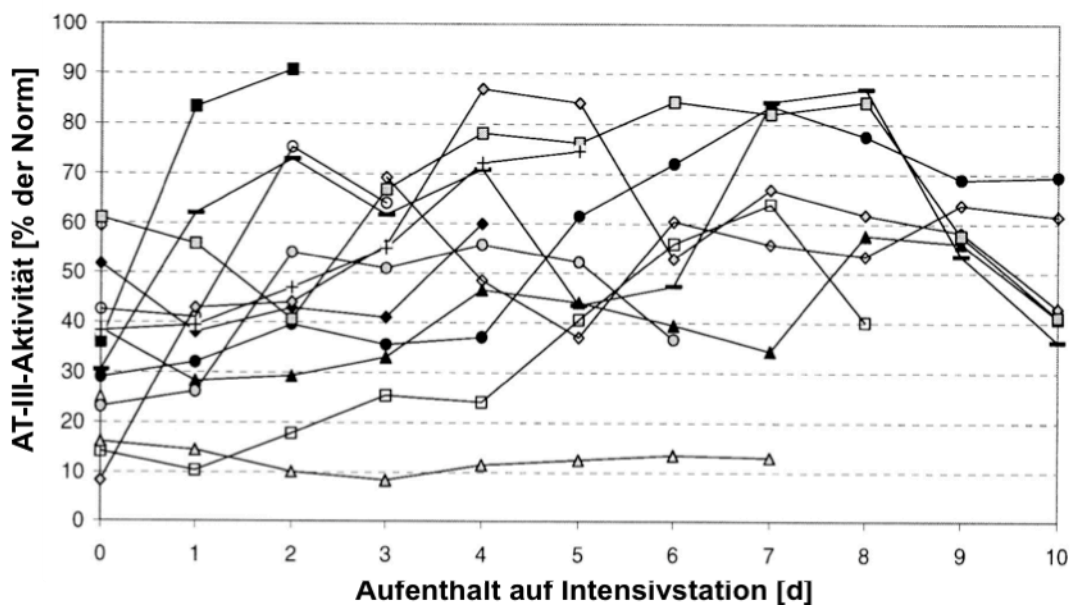


Abb. 12d: AT-III-Aktivität, Verlauf über 10 Tage

Patienten 49-62



3.9 Protein C

Die Protein-C-Funktion der $n = 62$ Patienten wurde ebenfalls bei Aufnahme bestimmt. An Tag 0 konnten Werte von 63.3 ± 24.4 % der Norm, an Tag 1 Werte von 68.0 ± 26.5 % der Norm bestimmt werden (Abb. 13a–d). Der Normwert betrug 100 ± 15 %.

Abb. 13a: Protein-C-Funktion, Verlauf über 10 Tage

Patienten 1-16

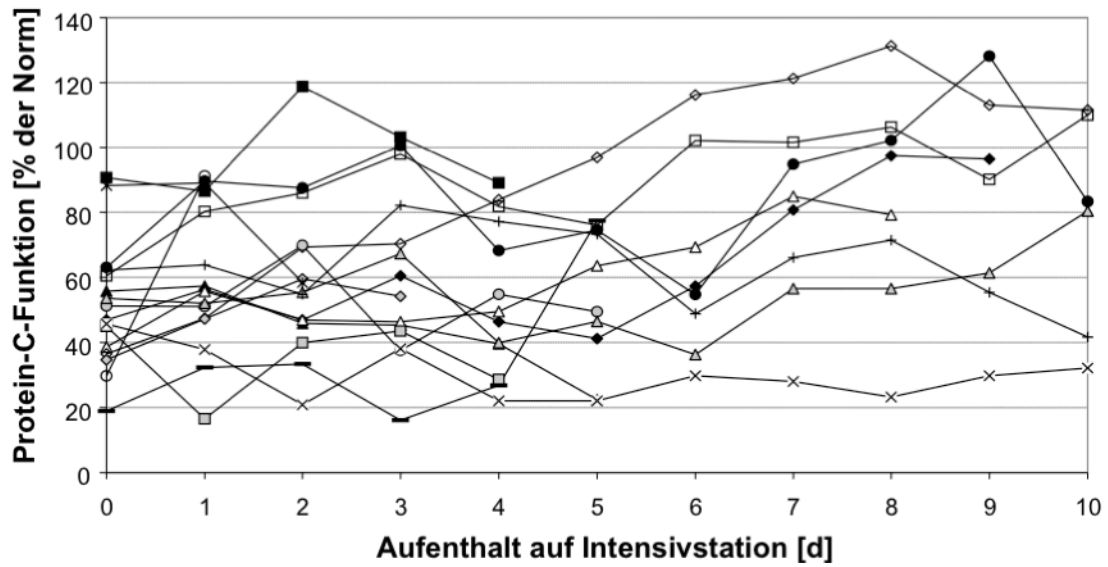


Abb. 13b: Protein-C-Funktion, Verlauf über 10 Tage

Patienten 17-32

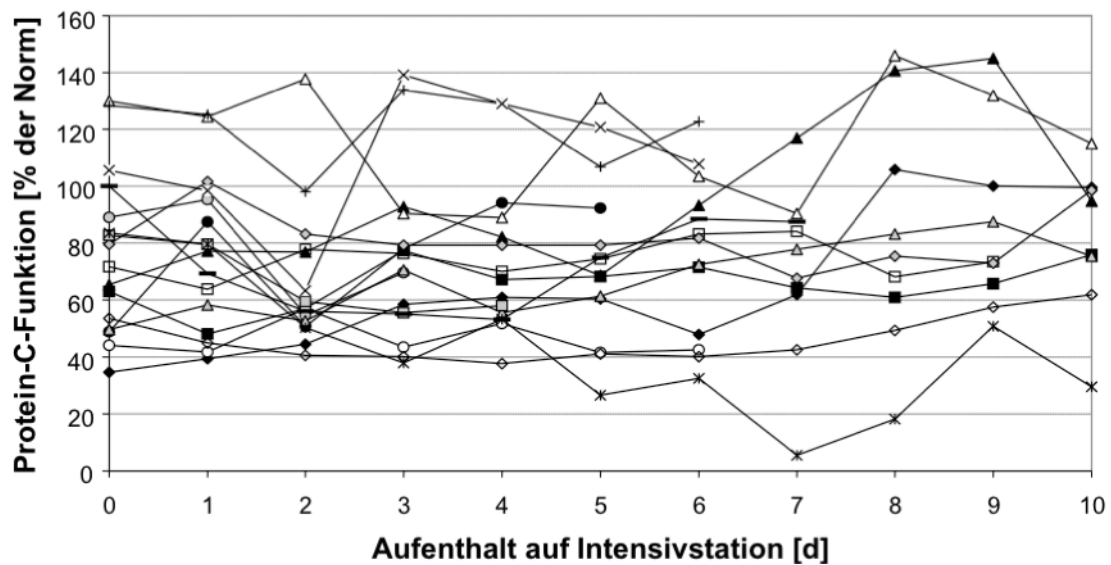


Abb. 13c: Protein-C-Funktion, Verlauf über 10 Tage

Patienten 33-48

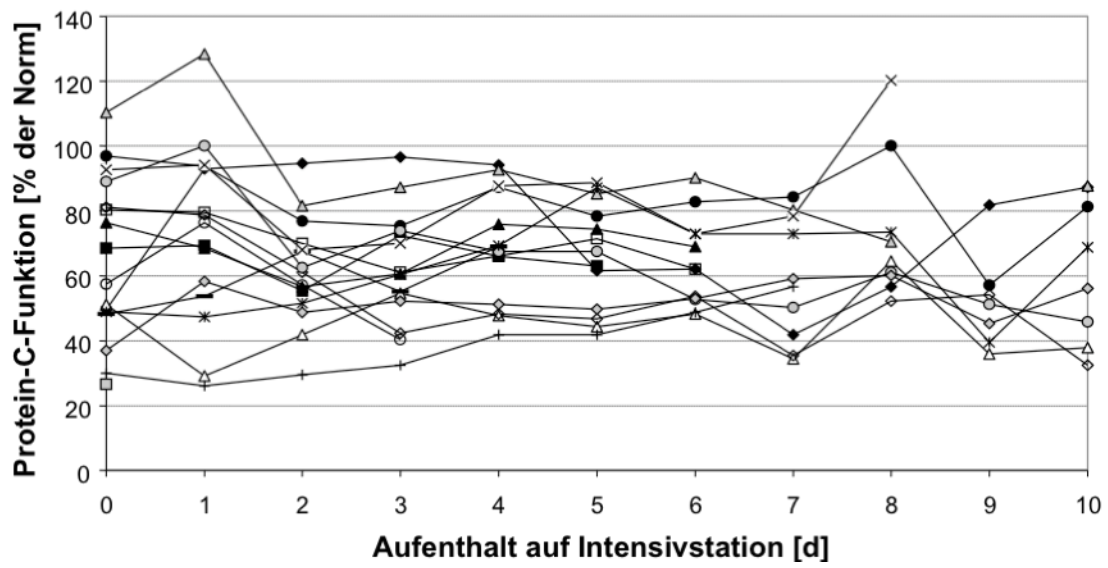
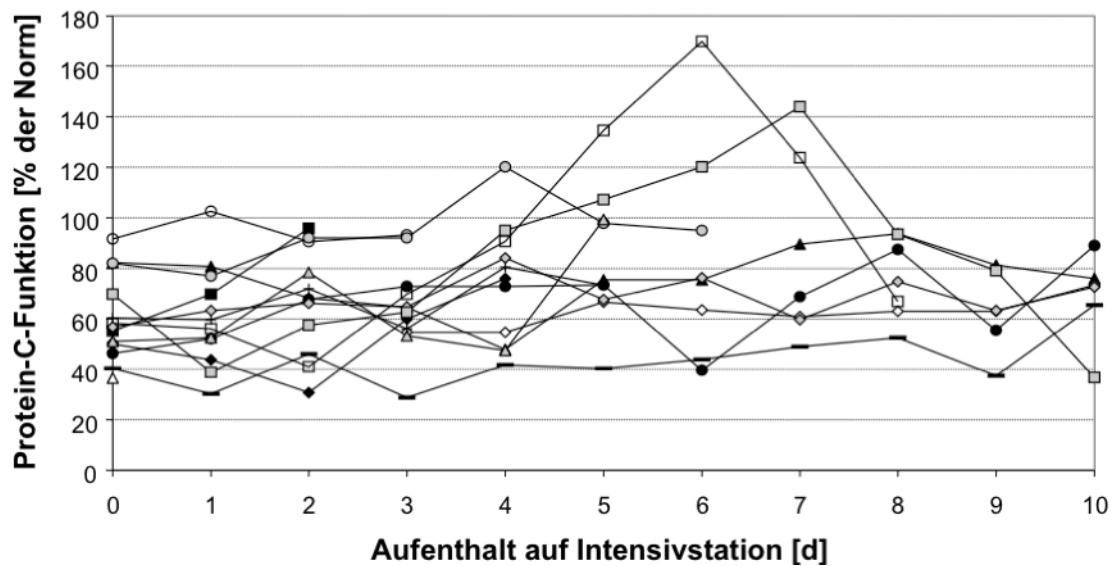


Abb. 13d: Protein-C-Funktion, Verlauf über 10 Tage

Patienten 49-62

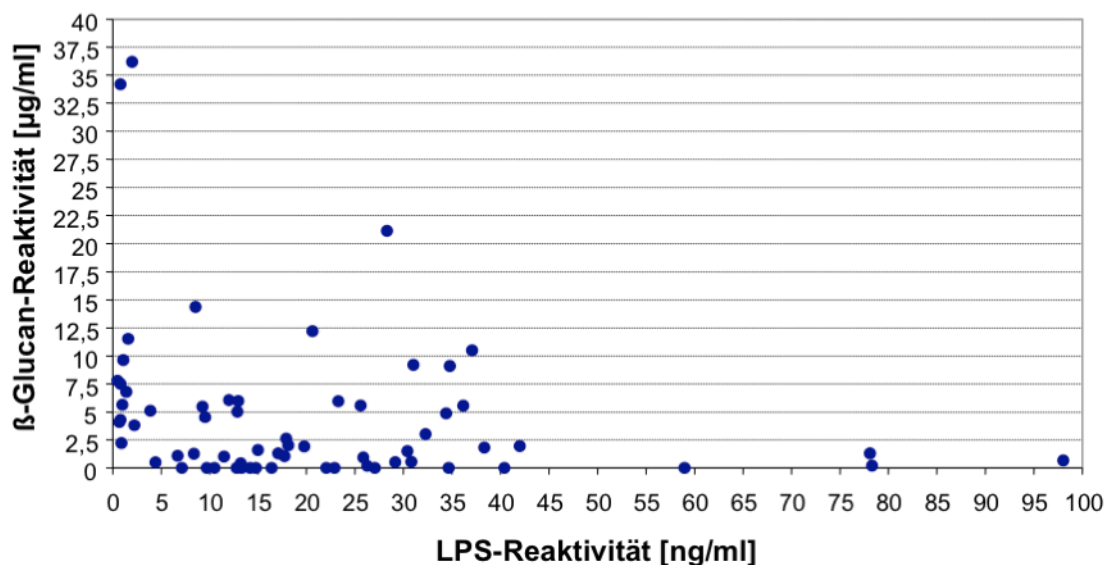


3.10 LPS und β -Glucan

Abb. 14a stellt die unterschiedlichen Endotoxin-Reaktivitäten aufgrund der jeweiligen Entität der Sepsis dar. 35 % der Patienten (22/62) zeigten bei einer gramnegativen Sepsis eine LPS-Reaktivität von 27.8 ± 23.4 (Messwerte zwischen 4.4 - 98) ng/ml. 19 % der Patienten hatten eine Sepsis aufgrund eines Pilzbefalls und boten darunter β -Glucan-Reaktivitäten von 11.1 ± 11.5 (Messwerte zwischen 1-21) μ g/ml. Bei 48 % der Patienten (30/62) konnte eine kombinierte Sepsis mit sowohl gram negativem als auch fungalem Ursprung festgestellt werden. Unter diesem Keimbefall wurde bei den Patienten eine LPS-Reaktivität von 23.1 ± 15.1 ng/ml (Werte zwischen 3.9-42 ng/ml) und eine β -Glucan-Reaktivität 5.1 ± 4.7 μ g/ml (Werte zwischen 2.2-36 μ g/ml) gemessen.

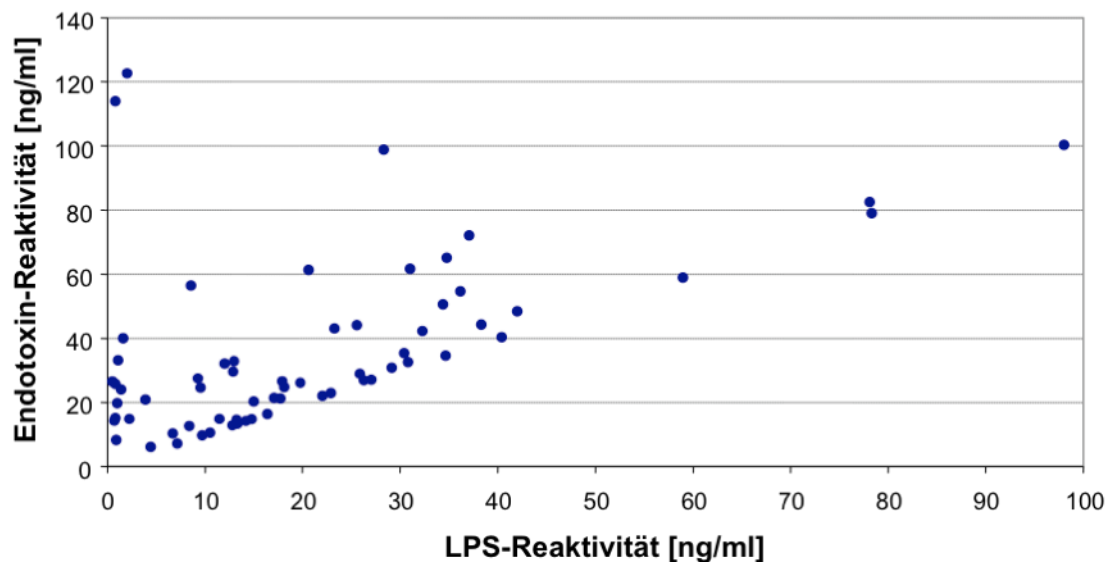
Insgesamt wurden bei den Patienten LPS-Reaktivitäten von 20.5 ± 19.6 ng/ml und β -Glucan-Reaktivitäten von 4.7 ± 7.0 μ g/ml gemessen ($r = 0.254$). LPS-Reaktivitäten von etwa 2 ng/ml und β -Glucan-Reaktivitäten von etwa 0.5 μ g/ml sind die Schwellenkonzentrationen für eine PDIC [172].

Abb. 14a: LPS-/ β -Glucan-Reaktivität



Da die pathophysiologische Wirkung der LPS-Reaktivität im Vergleich zur β -Glucan-Reaktivität 300fach stärker erschien, wurde, um die globale Endotoxin-Reaktivität des Plasmas zu bestimmen, die β -Glucan-Reaktivität durch 300 dividiert und zur jeweiligen LPS-Reaktivität addiert (Abb. 14b). Durch diese Maßnahme konnte eine globale Endotoxin-Reaktivität der Patienten bei Eintreffen auf der Intensivstation von 36.2 ± 26.3 ng/ml gemessen werden ($r = 0.521$).

Abb. 14b: LPS-/Endotoxin-Reaktivität



Die intra-Assay Variationskoeffizienten aller funktionellen Tests oder Antigen-tests waren kleiner als 5 % bzw. 10 %.

4. Diskussion

In zahlreichen Arbeiten wurde die enge Verknüpfung zwischen der bereits frühzeitig im Krankheitsverlauf der Sepsis auftretenden Aktivierung der Gerinnung und der vorliegenden Entzündungsreaktion herausgearbeitet. Biomarker der Entzündungsreaktion und Hämostase wurden mit sehr unterschiedlichen Ergebnissen bestimmt.

4.1 sCD14

CD14 ist sowohl in membranständiger als auch in gelöster Form maßgeblich an der Initiation der Entzündungsreaktion beteiligt. Berner et al. beschrieben sCD14 als Marker der early-onset-Sepsis bei Neugeborenen, welcher mit einer hohen Mortalität korrelierte [15]. In der Studie von Hozumi et al. fanden sich auch im Tiermodell deutlich erhöhte sCD14-Spiegel, welche nach LPS-Kontakt freigesetzt wurden [72]. Andere Studien konnten keine signifikanten Unterschiede in Plasmaspiegeln zwischen gesunden Probanden und an Sepsis erkrankten Patienten sehen [139]. In einem weiteren Tiermodell wurde bei transgenen Mäusen, welche besonders hohe sCD14-Spiegel aufwiesen, ein besseres Outcome und eine geringere Mortalität nach LPS-Exposition beobachtet [79].

sCD14 wies in unseren Messungen keine deutlichen Plasmaspiegelunterschiede auf, welche eine eindeutige Unterscheidung zwischen Gesunden und Sepsispatienten ermöglichen würde. sCD14 erschien daher als Marker für eine ausgeprägte Monozytendestruktion und Sepsis nicht geeignet. Da das Plasma von Intensivpatienten sich als relativ instabil zeigte, wurden die entnommenen Proben unseres Kollektivs vor dem Einfrieren mit Arginin vorbehandelt [165], um einer proteolytischen Zersetzung der Zellen und einer möglichen Abspaltung des membranständigen CD14 entgegenzuwirken. Bei nicht vorbehandelten Proben könnte es durch diesen Mechanismus bereits in der präanalytischen Phase zu artifiziell erhöhten sCD14-Spiegeln gekommen sein.

Eine zügige Verarbeitung der frisch entnommenen Proben oder eine Stabilisierung sollte in diesem Zusammenhang überdacht werden. In dieser experimentellen Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von Arginin-stabili-

sierterm EDTA-Plasma gut reproduzierbare Ergebnisse liefert.

4.2 sL-Selectin

L-Selectine sind an der ersten Endothelanhaftung der Leukozyten beteiligt. Auch das anschließende „rolling“ auf der Zellmembran wird durch sie vermittelt [50]. Metalloproteasen führen bei Entzündungsreaktionen zur inflammatorisch bedingten Abspaltung der Glycoproteine von der Zelloberfläche.

In unseren Messungen fanden sich deutlich erhöhte sL-Selectin-Spiegel im untersuchten Patientenkollektiv. Auch in den Untersuchungen von Mc Gill et al. [112], Ahrens et al. [3], Spertini et al. [164] und Kourtis et al. [93] wurden signifikant erhöhte sL-Selectin-Spiegel bei Erwachsenen bzw. Neugeborenen mit Sepsis nachgewiesen.

In Tiermodellen konnte im Rahmen einer Sepsis ein protektiver Effekt von erhöhten sL-Selectinspiegeln beobachtet werden. Sowohl die Anhaftung von Leukozyten an die Endothelzelle als auch das „rolling“ traten in reduziertem Umfang auf und führten somit, aufgrund von verminderter Leukozytendapedese, zu einem weniger ausgeprägten Endothelschaden. Dieser Mechanismus könnte letztlich vor Endorganschäden im Rahmen der Sepsis schützen. Im Falle einer Sepsis mit zusätzlicher Sekundärinfektion könnte dieses Szenario zu einer reduzierten Immunantwort führen und sich somit negativ auswirken [50, 51].

Anders als in unseren Untersuchungen fanden sich in der Arbeit von Figueras-Aloy et al. [53] keine signifikant veränderten sL-Selectin-Serumspiegel bei septischen Neugeborenen im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Die Autoren verwiesen hier auf die Notwendigkeit einer äußerst frühzeitigen Blutentnahme, um Veränderung des sL-Selectinspiegels zuverlässig messen zu können, da dieser früher als der Spiegel anderer Adhäsionsmoleküle ansteigt und danach wieder zurückgeht. Auch Gando et al. [61] konnten in ihrer Studie keine signifikanten Unterschiede zwischen Probanden und Patienten mit Sepsis bzw. Sepsis und DIC nachweisen. Die Werte zeigten sich tendenziell sogar erniedrigt. Gando et

al. verwiesen bei der Diskussion ihrer Resultate auf die Bindung von sL-Selectin an einen Liganden, der im Rahmen der Immunreaktion von Endothelzellen sezerniert wurde. Seidelin et al. [157] zeigten in ihrer prospektiven Studie signifikant reduzierte sL-Selectin-Spiegel bei Sepsispatienten. Verstorbene wiesen im Vergleich zu Überlebenden ebenfalls signifikant niedrigere Spiegel auf. Daher konnte der sL-Selectin-Spiegel als prognostischer Marker empfohlen werden. Aus pathophysiologischer Sicht hätte man bei Sepsispatienten höhere sL-Selectin-Spiegel erwartet. Als Ursachen dieser Diskrepanzen wären die bereits genannten Phänomene (Blutentnahmezeitpunkt, Stabilisierung, Ligandenbindung) zu diskutieren.

4.3 Phospholipase A₂

Sekretorische Phospholipase A₂ (sPLA₂) konnte in Tiermodellen als ein wichtiger Entzündungsmarker gesichert werden. Durch LPS wurde eine vermehrte Freisetzung und eine daraus resultierende wichtige Rolle in der weiteren Vermittlung der Entzündungsreaktion beobachtet [102, 185].

Die Monozytenmembran ist reich an Phospholipasen und veresterter Arachidonsäure, welche die Vorläufersubstanz der Prostaglandin- oder Leukotrien-Synthese bilden. Bei der Aktivierung der Monozyten durch LPS kommt es zu Veränderungen der Membranphospholipide [78], die über die PLA₂-Aktivierung eine Zunahme der Membranfluidität der Zellen zur Folge hat. Durch Anhäufung ungesättigter Fette wird die Phagozytose des Pathogens erleichtert und die Arachidonsäurekaskade initiiert [2, 41, 175]. Während einerseits LPS die Phagozytose der Monozyten unterstützt, so kann andererseits ein stark erhöhter LPS-Spiegel zum Membranleck der Zellen und schließlich zur Zelldestruktion führen. Da dieser Vorgang jedoch zur weiteren PLA₂-Freisetzung und Aktivierung führt, wird durch diesen Mechanismus weiterer Zellschaden gefördert und über Zellfragmente oder PLA₂ Kallikrein aktiviert [110, 201]. Vadas et al. konnten eine stark gesteigerte plasmatische PLA₂-Aktivität bei Patienten im septischen Schock zeigen [190]. Bei gesunden Menschen konnte in der Studiengruppe von Pruzanski et al. eine mehr als zehnfach gesteigerte PLA₂-Aktivität durch intravenöse LPS-Injektion ausgelöst werden [144].

In unserem Patientenkollektiv konnte eine leichte Erhöhung der PLA₂-Aktivität gemessen werden. Da Überlappungen zwischen gesunder Kontrollgruppe und Patientenkollektiv jedoch vorkamen, konnte PLA₂ nicht als zuverlässiger Parameter zur Sepsisdiagnostik eingestuft werden.

Die aus pathophysiologischer Sicht zu erwartende signifikante Erhöhung der Phospholipase A₂-Werte konnte an unserem Patientenkollektiv nicht gezeigt werden. Durch das künstliche Substrat Hexadecylphosphocholin, welches in unserem PLA₂-Test genutzt wurde, könnte es durch unphysiologische Bedingungen zur artifiziellen Veränderung der Ergebnisse gekommen sein. Der biologische Effekt des Lipides Hexadecylphosphocholin ist aktuell noch nicht geklärt. Durch Nutzung eines physiologischen Tests oder eines Antigen-Tests sollten die PLA₂-Spiegel erneut erhoben werden, um die Messungen gemeinsam mit den Ergebnissen anderer Studiengruppen erneut kritisch beurteilen zu können.

4.4 Tissue factor

In der Arbeit von Butenas et al. konnten bei Gesunden weder eine messbare tissue factor-Aktivität, noch das tissue factor-Antigen auf Thrombozyten oder inaktiven Monozyten festgestellt werden. Nach Exposition mit LPS wurde eine Expression von tissue factor bei 98 % der Monozyten gesehen [28].

Der von uns genutzte ELISA detektierte tissue factor, TF-apo und TF- Faktor VII-Komplexe. Im Patientenkollektiv fanden sich von Beginn des intensivstationären Aufenthalts an deutlich erhöhte TF-Spiegel. Diese stehen im Einklang mit Arbeiten von Gando et al., Osterud et al. und Franco et al. [56, 60, 134], welche ebenfalls deutlich erhöhte tissue factor-Spiegel als Marker der aktivierten Gerinnungskaskade sichern konnten.

Egorina et al. teilten das in ihrer Arbeit untersuchte Kollektiv, aufgrund unterschiedlicher Reaktionen auf Endotoxinstimulation, in high- und low-responder und legten dabei besonderes Augenmerk auf die Expression des Oberflächen-Antigens des tissue factors. Während im Blut der high-responder-Gruppe mehr

tissue factor-Oberflächen-Antigen und tissue factor bestückte Mikropartikel zu finden waren, reagierte die low-responder-Gruppe mit einem gesteigerten Anteil an intrazellulärem tissue factor [44]. Im Rahmen ihrer Ergebnisse stellten Egorina et al. die Hypothese auf, dass high-responder in einem erhöhten Maße gefährdet seien, Hyperkoagulationen zu entwickeln. In einer Untersuchung von Aras et al. kam es nach intravenöser Injektion von LPS beim Menschen zu einem massiven Anstieg der tissue factor enthaltenden Mikropartikel [7]. Neben dem zellgebundenen tissue factor und dem an Mikropartikeln haftenden konnte inzwischen auch eine lösliche Form gesichert werden, welche ebenfalls als klinischer Marker der entzündungsbedingten Gerinnungsaktivierung von Bedeutung sein könnte [176].

4.5 Zirkulierende amidolytische Thrombinaktivität

Faktor Xa spaltet mit Hilfe des Kofaktors Va Prothrombin zu Thrombin. Thrombin seinerseits führt durch Aktivierung der Faktoren V und VIII zur Ausdehnung der Gerinnungsaktivierung und zur weiteren Thrombingeneration. Durch die vorangegangene Aktivierung der Gerinnungskaskade konnte in unserer Arbeit auch eine deutlich erhöhte Thrombinaktivität als Zeichen des prokoagulatorischen Statuses gemessen werden. Durch Verwendung niedriger finaler Konzentrationen eines guten chromogenen Thrombinsubstrats in Verbindung mit einer finalen supramolaren Konzentration an Arginin konnte spezifisch die zirkulierende amidolytische Thrombinaktivität gemessen werden. Der Test wird durch thrombin-ähnliche Enzyme der Hämostase wie z.B. Kallikrein nicht verfälscht [167]. Bei Substratkonzentrationen von $>0,6$ mM, insbesondere ohne Zusatz von Arginin, wird das chromogene Substrate in einer Plasmamatrix unspezifisch gespalten. Um artifizielle Veränderungen der Thrombinaktivität im gewonnenen Patientenplasma während der präanalytischen Phase zu vermeiden, wurden die Proben unseres Patientenkollektivs mit supramolaren Konzentrationen Arginin stabilisiert. Auch in normalem Plasma können Spuren von Thrombinaktivität gemessen werden. α_2 -Makroglobulin und Fibrin reagieren mit Thrombin [70, 146]. Thrombin, das in α_2 -Makroglobulin eingeschlossen ist, behält seine amidolytische Aktivität (vergleichbar einem Taucher in einem Haifischkäfig). Die normale Aktivität des plasmatischen Thrombins liegt bei $5,5 \pm$

1,1 mIU/ml [167]. Dieser 100 ± 20 % Normwert, der eine normale intravaskuläre Gerinnung (NIC) widerspiegelt, steigt bei Patienten mit PDIC häufig deutlich an. Es finden sich oft um ca. 50 - 100 % gesteigerte Aktivitäten, die somit in der Diagnostik der PDIC von enormer Bedeutung sind. Amidolytisches Thrombin ist aufgrund seiner Unabhängigkeit von Leberfunktion und Antithrombin-III-Aktivität, welche beide durch eine systemische Entzündungsreaktion deutlich beeinträchtigt sind, ein sehr guter PDIC-Marker.

Zirkulierendes proteolytisches Thrombin wandelt Fibrinogen in lösliches Fibrin um. Dieses wird möglicherweise durch ein überproportional ansteigendes Fibrinogenfunktion/Fibrinogenantigen Verhältnis angezeigt. Zirkulierendes proteolytisches Plasmin konvertiert Fibrinogen oder Fibrin in Fibrin(ogen)spaltprodukte. Dies würde dann durch ein überproportional absinkendes Fibrinogenfunktions/Fibrinogenantigen-Verhältnis symbolisiert.

Eine Reihe nichtkoagulatorischer Effekte, welche die Pathogenese der PDIC beeinflussen, werden Thrombin zugeordnet. Vor allem die Zytokinproduktion betreffende Effekte, wie die Induktion der Produktion von MCP-1 (Monocyte chemotactic protein-1) und IL-6 in Fibroblasten, Monozyten und Endothelzellen, konnten in vitro nachgewiesen werden [83]. Auch die Produktion von IL-8 in Endothelzellen wird Thrombin zugeschrieben. Die zellaktivierenden Eigenschaften Thrombins werden über die proteaseaktivierten Rezeptoren (PARs) 1,3 und 4 vermittelt [84]. Über diese Rezeptoren wurden Thrombin bereits auch zeitabhängig zellprotektive Eigenschaften zugesprochen. Kaneider et al. konnten im Tiermodell zeigen, dass die LPS-bedingte Aktivierung des PAR-1 in der ersten Phase der Sepsis zwar deutliche Schädigungen der Lunge, im Sinne eines „pulmonary leak“, und PDIC verursacht, jedoch konnte im weiteren Verlauf auch durch eine PAR-1-vermittelte Transaktivierung des PAR-2 die Hemmung von PDIC beobachtet werden. Die Rolle der proteaseaktivierten Rezeptoren im Verlauf der Sepsis ist aktuell noch nicht eindeutig geklärt und wird kontrovers diskutiert [29, 86, 125, 140]

4.6 Fibrinogen-Antigen und Fibrinogenfunktion

Sowohl Fibrinogen als auch Fibrinospaltprodukte wurden gemessen, um die Diagnose der PDIC im Zusammenhang mit vorliegenden Scores frühzeitig zu sichern. Da es bei der alleinigen Messung des Fibrinogens durch Trauma, Operationen o. ä. über extravaskulär gebildetes Fibrin zur artifiziellen Veränderung der Spiegel kommen kann und vor allem intravasculäres Fibrinogen bei der Diagnostik der „overt DIC“ von Bedeutung ist, wurden Funktion und Antigen von Fibrinogen gemessen.

Andere Arbeiten wiesen erhöhte Mengen sowohl gelösten Fibrins als auch denaturierter Fibrinospaltprodukte im Zusammenhang mit Sepsis und disseminierter intravasaler Gerinnung nach [37, 38, 129, 158]. Auch in unserem Patientenkollektiv wurde mittels FIATA eine signifikante Erhöhung des Fibrinogen-Antigens festgestellt. Bei dieser Messung wurden sowohl Fibrinogen als auch gelöstes Fibrin und durch Proteasen denaturiertes Fibrinogen als Antigen erkannt [169]. Welcher Anteil dieses gemessenen Fibrins/Fibrinogens jedoch noch in der Lage war, die Gerinnungssituation durch weiter bestehende Aktivität zu beeinflussen, musste durch einen weiteren Test erst geklärt werden, den FIFTA.

Der FIFTA ist ein Assay, welcher die Konversion von Fibrinogen zu Fibrin im gerinnenden Plasma imitiert und den Anteil des vorhandenen Fibrinogens, welches noch zur Gerinnung beitragen kann, bestimmt [171].

Da Albumin als negatives Akute-Phase-Protein agiert und somit allein durch eine vorliegende Entzündungsreaktion in deutlich reduzierten Mengen auftreten kann [137], wurde durch den FIFTA ein albuminunabhängiger Test genutzt, um Beeinflussungen der Ergebnisse durch die bei Intensivpatienten häufig vorliegenden Hypoalbuminämien auszuschließen [52]. Durch diesen neuen, physiologischen, funktionellen Fibrinogen-Test konnte eine massiv erhöhte Fibrinogenaktivität in unserer Patientengruppe nachgewiesen werden.

4.7 D-Dimere

D-Dimer-Spiegel wurden von Wada et al. als sensitive Marker der pre-PDIC-Phase beschrieben [199]. Fibrin-Abbauprodukte können durch Zunahme der D-Dimer-Spiegel nachgewiesen werden [60,111]. Asakura et al. konnten sowohl signifikant erhöhte D-Dimer-Spiegel bei Sepsispatienten mit PDIC, als auch eine signifikante Korrelation zwischen D-Dimer-Spiegeln und den ISTH „overt DIC“ Diagnostikkriterien feststellen. Cutoff-Werte wurden beschrieben, jedoch blieb die Differenzierung zwischen Patienten im pre-PDIC-Stadium und Patienten ohne PDIC schwierig. D-Dimer-Spiegel konnten allein nicht die Gruppe der survivor von der Gruppe der non-survivor unterscheiden [8]. Voves et al. konnten hingegen signifikant höhere D-Dimer-Spiegel bei der Gruppe der non-survivor bestimmen und auch Parallelen zwischen der Höhe der D-Dimer-Spiegel und der Schwere der Erkrankung ziehen [198]. Constantinescu et al. beobachteten PDIC ohne Erhöhung der D-Dimer-Konzentrationen [31]. Supprimierte D-Dimer-Level wurden von Dempfle et al. bei Patienten im septischen Schock im Zusammenhang mit einem schlechten Outcome beobachtet [39]. Die Kombination aus den Symptomen der Hyperkoagulation und hyperfibrinolytischen Markern wurde zur Diagnose der PDIC und Steigerung der Sensitivität und Spezifität von Asakura et al. empfohlen [8].

Auch in unserem Patientenkollektiv konnten stark erhöhte D-Dimer-Spiegel nachgewiesen werden. Die Patienten wiesen D-Dimere von $4,0 \pm 3,6 \mu\text{g/ml}$ auf. Im gesunden Kontrollkollektiv konnten D-Dimer-Spiegel von $0,049 \pm 0,025 \mu\text{g/ml}$ gemessen werden, sodass eine deutliche Unterscheidung der Erkrankten von der gesunden Kontrolle möglich war. Die Interpretation dieser erhöhten Spiegel der Fibrinabbauprodukte bleibt jedoch vor dem Hintergrund, dass zwischen einer Aktivierung der Gerinnung (inklusive Faktor XIIIa) und einer Aktivierung der Fibrinolyse nicht unterschieden werden kann, schwierig. Da beide Vorgänge eine gesteigerte Freisetzung von D-Dimeren zur Folge haben, sollte dieser Parameter vor allem im Kontext mit anderen Hämostaseparametern interpretiert werden.

4.8 Antithrombin III

Antithrombin III wird von der Leber synthetisiert und greift an zahlreichen Stellen der Gerinnungskaskade hemmend und somit antikoagulatorisch ein [106, 107, 196]. Durch die Bindung von Antithrombin III an spezielle endotheliale sulfatierte Glycosaminoglycane wird die Synthese von Prostacyclinen aktiviert. Diese führen zum einen zur Reduktion von Zell-Zell-Interaktionen zwischen Endothelzellen und Neutrophilen, andererseits wird die Thrombozytenaggregation durch diesen Mechanismus deutlich gehemmt. Durch Heparin oder endotheliale Glycosaminoglycane konnten Konformationsänderungen beobachtet werden, welche eine Maximierung der antikoagulatorischen Aktivität von Antithrombin III zur Folge hatten [130]. In unserem Patientenkollektiv konnten reduzierte Antithrombin III-Spiegel nachgewiesen werden. Neben vielen anderen Studiengruppen, welche sich mit der Beeinträchtigung der antikoagulatorischen Mechanismen unter Sepsis beschäftigten, konnten ähnliche Ergebnisse bereits durch Lorente et al., Fourrier et al. und Mesters et al. berichtet werden. Vor allem eine rasche Reduktion der AT III-Spiegel musste hierbei mit einem schlechten Outcome in Zusammenhang gebracht werden [54, 104, 113].

Über eine 1:1-Komplexbildung kommt es aufgrund rasch zunehmender Thrombinmengen zur deutlichen Reduktion der Antithrombinspiegel. Auch der Abbau durch Proteasen vermindert die AT III-Spiegel weiter und kann, ebenso wie eine verminderte Lebersyntheseleistung, zur Beeinträchtigung der antikoagulanten Bilanz beitragen. Jochum et al. und Inthorn et al. konnten durch Gabe von AT III eine verminderte Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen bei Sepsispatienten beobachten [75, 82]. Zahlreiche experimentelle Studien an Tiermodellen, mehrere Phase II-Studien an Sepsispatienten und die KyberSept-Studie, eine Phase III-Studie, wurden durchgeführt und versuchten die vorangegangenen viel versprechenden Ergebnisse anhand der klinischer Effektivität einer Antithrombin III-Therapie bei Sepsis zu sichern [11, 40, 45, 55, 64, 74, 136]. Eindeutige Empfehlungen existieren bis dato nicht.

4.9 Protein C

Das Thrombomodulin-Protein-C-System ist ein antikoagulatorischer Mechanismus, welcher dysfunktionell wird. Bis dato konnten reduzierte Thrombinformation, gesteigerte Fibrinolyse [147], Hemmung der NF κ B-Aktivierung und verminderte, entzündungsbedingte Freisetzung von Zytokinen auf die Wirkung von aktiviertem Protein C zurückgeführt werden [203]. Die Studiengruppe um Feistritzer et al. und Isermann et al. konnten protektive Wirkungen von aktiviertem Protein C auf die Endothelintegrität nachweisen [49, 76].

Die Therapie mit aktiviertem Protein C wurde in Fällen von schwerer Sepsis und DIC durch die PROWESS-Studie geprüft und konnte eine Reduktion der 28-Tage-Mortalität in der Drotrecogin- α -Gruppe nachweisen [14]. Sowohl durch die Änderungen der Einschlusskriterien während der Studie, welche als Resultat einen Shift hin zu weniger schwer erkrankten Patienten hatten [159, 204], als auch die veränderten Herstellungsbedingungen des aktivierten Protein C während der laufenden Studie, führten aufgrund einer Häufung der Mortalität in der Protein-C-Gruppe zur kritischen Reflektion der Ergebnisse. Von einer eindeutigen Therapieempfehlung mit aktiviertem Protein C wurde Abstand genommen.

In unseren Untersuchungen konnten leicht reduzierte Protein-C-Spiegel im Patientenkollektiv gemessen werden. Die erhobenen Werte boten jedoch, im Vergleich zu anderen von uns erhobenen Parametern, eher geringere Abweichungen zur Kontrollgruppe. Sie korrelieren dennoch mit Beobachtungen anderer Studiengruppen sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen. Song et al. konnten im Tiermodell bei Mäusen deutlich reduzierte Gesamt- Protein-C-Spiegel nach LPS-Gabe messen [163]. Opal et al. arbeiteten die Laborparameter, welche von 1690 Patienten mit Sepsis zu Beginn der PROWESS-Studie gewonnen wurden, auf. Auch sie berichteten über reduzierte Protein-C-Spiegel bei 80 - 90% ihres Patientenkollektivs, wobei die niedrigsten Protein-C-Spiegel bei Patienten mit fungaler Sepsis beobachtet wurden [132].

Durch die aktivierte Gerinnung kommt es im Rahmen von Sepsis sowohl über den Verbrauch als auch über den Abbau von Protein C durch proteolytische

Enzyme, wie neutrophile Elastase, zu einem reduzierten Protein-C-Spiegel. Durch Mikrozirkulationsstörungen und Verbrauch von Substraten wird die Syntheseleistung der Leber sukzessive reduziert [43, 114, 195]. Die Aktivierung des verbleibenden noch inaktiven Protein C wird durch zytokinbedingte Downregulation von Thrombomodulin auf den Endothelzellen erschwert und behindert [48, 124, 180]. Die Plasmaspiegel von C4bBP, einem Protein des Komplementsystems, steigen als Konsequenz der akuten-Phase-Reaktion. Protein S ist ein wichtiger Kofaktor von Protein C und liegt zu 60 % in komplexierter Form mit C4bBP im Plasma vor. Durch die vermehrte Komplexbildung von C4bBP und Protein S dürfte die Wirksamkeit des verbleibenden Protein C durch relativen Protein-S-Mangel weiter kompromittiert werden [100]. Resistenzmechanismen, welche z. B. durch überschießende Faktor VIII-Spiegel ausgelöst sein könnten, könnten weiterhin eine wichtige pathophysiologische Bedeutung für die Entstehung der DIC unter Sepsis darstellen [34].

4.10 LPS und β -Glucan

Das humane Hämostasesystem reagiert besonders empfindlich auf Endotoxine (hier klinisch als LPS oder β -Glucan verstanden). Dies führt bei Patienten mit schwerer Sepsis oder im septischen Schock zu einer PDIC [25]. Ist die Konzentration freier Endotoxine über das Dreifache der Norm erhöht, führt dies zu einer gesteigerten Thrombinaktivität [168]. Aber auch gram positive Bakterien und eine Vielzahl weiterer Erreger können zu einer Sepsis und daraus resultierenden DIC führen [91, 132]. Normalerweise wird der Begriff Endotoxin für Lipopolysaccharide verwendet, aber auch β -Glucane aus Pilzen können klinisch wie Endotoxine wirken, welche eine Stimulation der Zytokinfreisetzung zur Folge haben [18, 90, 202]. Auch in unserer Untersuchung konnte belegt werden, dass β -Glucane eine, den Lipopolysacchariden ähnliche, pathophysiologische Rolle spielen. Um jedoch vergleichbare plasmatische Reaktivitäten zu erlangen, wurden 300fach höhere Konzentrationen benötigt [168]. Es wurde versucht, die globale Endotoxin-Reaktivität des Plasmas abzubilden, um diese vergleichbar darzustellen. Die β -Glucanaktivität wurde daher, nach entsprechender Gewichtung (1/300), zur jeweiligen Lipopolysaccharidreaktivität addiert. Eine Lipopolysaccharidreaktivität von mindestens ca. 2 - 3 ng/ml bzw. eine β -Glucan-

reaktivität von mindestens ca. 0,5 - 1 µg/ml werden als Schwellenwertkonzentrationen für die Entwicklung einer PDIC betrachtet.

Der pathophysiologische Ablauf der PDIC bei Sepsispatienten beinhaltet möglicherweise die Aktivierung des toll-like-Rezeptors Typ 4 auf Monozyten durch niedrige LPS-Konzentrationen [186] und die toxische Wirkung von Endotoxinen auf Monozyten durch hohe LPS-Konzentrationen (> 5 ng/ml) [42, 87]. Circa 10 ng/ml Lipopolysaccharide oder 1 µg/ml β-Glucan zerstören circa 30 % der Blutmonozyten innerhalb einer Inkubationszeit von 1 Stunde bei 37 °C [168]. Die Zellfragmente triggern die Freisetzung von Kallikrein und Thrombin. Über Thrombin erfolgt die Generation hoher löslicher Fibrinmengen, welche sich am Endothel ablagern. Endotoxin oder reaktive Sauerstoffradikale verstärken das Rollen der polymorphkernigen Neutrophilen [141], durch welche die endotheliale Fibrinschicht angegriffen wird [73]. Ihre porfibrinolytische Kapazität ist bei einer Sepsis jedoch nicht ausreichend. Die Mikrothromben wachsen, das Organ wird ischämisch und ein Multiorganversagen resultiert [191]. Hochdosis-Antithrombin III, der Hauptinaktivator des Thrombins, wurde auf seine theoretische Anwendbarkeit getestet, den Selbsterhaltungsprozess der PDIC zu durchbrechen [73, 187]. Über die pharmakologische Potenz des AT III wird jedoch kontrovers diskutiert [203, 207].

5. Zusammenfassung

Die frühe Diagnose der Sepsis und der pathologischen disseminierten intravaskulären Gerinnung (PDIC) und damit auch die frühzeitige Einleitung der Therapie ist heute eine der zentralen Herausforderungen der Medizin. Die vorliegende laborchemische Arbeit beschäftigte sich mit der Erhebung von Hämostaseparametern bei Patienten mit schwerer Sepsis. Sowohl aktuell zur Diagnose der Sepsis und PDIC etablierte als auch neue Parameter wurden untersucht. Hämostaseparameter, welche eine klare Abgrenzung zur Norm ermöglichen, geben wertvolle Hinweise auf die Entwicklung von Sepsis und PDIC.

Die Thrombozytenzahl, Antithrombin-III-Aktivität, Fibrinogen und die D-Dimer-Konzentration sind etablierte Parameter der PDIC. Als innovative Parameter zur Diagnose von PDIC bei Sepsis konnten insbesondere die zirkulierende amidolytische Thrombinaktivität und die Endotoxin-Reaktivität aufgezeigt werden. Die eventuelle Bedeutung von Monozytenfragmenten wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls untersucht. sCD14 war in den von uns durchgeführten Messungen kein guter Marker einer schweren Sepsis. Tissue factor und sL-Selectin hingegen fanden sich in stark erhöhten Mengen im Plasma der Sepsispatienten und könnten die Leukozytenzerstörung widerspiegeln.

Verantwortlich für die Pathogenese der PDIC bei Sepsis könnte somit die toxische Wirkung von Endotoxinen auf Zellen, insbesondere auf Monozyten, sein. Die Zellfragmente triggern die Entstehung von Kallikrein und Thrombin. Zirkulierendes Thrombin generiert zirkulierendes Fibrin, welches sich am Endothel ablagert. Die fibrinolytische Kapazität ist bei Sepsis nicht ausreichend. Mikrothromben können wachsen, das Organ könnte ischämisch werden und ein Multiorganversagen resultieren.

Summary

Sepsis and septic shock almost invariably lead to hemostatic abnormalities. Clinical and experimental studies showed that it is the pathologic disseminated intravascular coagulation (PDIC) that causes microvascular dysfunction, which can result in organ failure. Rapid diagnosis of PDIC is a major challenge in clinical medicine. Many hemostasis parameters are available and the question arises, which of them, especially which of the new ones, can help to start a life rescuing treatment in time.

The aim of this thesis was to study markers of cell destruction and hemostasis activation in order to improve the rapid laboratory diagnosis of early severe sepsis. The alterations of hemostasis in septic patients compared to normal plasma were analysed.

Plasma of intensive care patients is very unstable. Therefore, in this study EDTA-plasma of intensive care patients or of healthy donors (control group) was stabilized for the first time by supramolar concentrations of arginine before freezing/thawing and analysis.

Established markers of PDIC are the thrombocyte count, antithrombin III-activity, fibrinogen- and D-dimer-concentration. The present study showed that quantification in plasma of the in vivo generated circulating amidolytic thrombin activity, fibrinogenfunction/-antigen ratio, tissue factor, sL-selectin, and endotoxin reactivity add much more important information about the pathophysiology of severe sepsis and enable a rapid diagnosis of early sepsis.

6. Abkürzungsverzeichnis

$\Delta A/h$	Absorptionsänderung pro Stunde
Abb.	Abbildung
AT III	Antithrombin III
DC	dendritische Zellen
DIC	Disseminierte intravasale Gerinnung
FIATA	Fibrinogen Antigenic Turbidimetric Assay
FIFTA	Fibrinogen Functional Turbidimetric Assay
IL	Interleukin
K-Domäne	Kunitz-Domäne
LBP	Lipopolysaccharid bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid
mCD14	membranständige Clusterdeterminante 14
MCP-1	monocyte chemotactic protein 1
MDP	macrophage/dendritic cell progenitor, Vorläufer der Makrophagen und dendritischen Zellen
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MPS	monozytäres Phagozytensystem
MVn	Mittelwert, Kontrollgruppe
MVp	Mittelwert, Patientengruppe
NO	nitric oxide, Stickoxid
PAF	plättchenaktivierender Faktor
PAP	Plasmin- α_2 -Antiplasmin-Komplex
PAR	proteaseaktivierter Rezeptor
PC(a)	Protein C (-Aktivität)
PDIC	pathologische disseminierte intravasale Gerinnung
(s)PLA ₂	(sekretorische) Phospholipase A ₂
ROS	reactive oxygen species (Sauerstoffradikale)
sCD14	lösliche Clusterdeterminante 14
SDn	Standardabweichung, Kontrollgruppe
sL-Selectin	lösliches L-Selectin

TAT	Thrombin-Antithrombin-Komplex
TF	tissue factor, Gewebethromboplastin, Faktor III
TFPI	tissue factor pathway inhibitor
TLR	toll-like Rezeptor
TNF α	Tumornekrosefaktor α
t-PA	tissue type plasminogen activator
u-PA	urokinase type plasminogen activator

7. Literaturverzeichnis

- 1 Abildgaard U. Binding of thrombin to antithrombin III. *Scand J Clin Lab Invest.* 1969; 24:23-7.
- 2 Aderem AA, Cohn ZA. Bacterial lipopolysaccharides modify signal transduction in the arachidonic acid cascade in macrophages. *Ciba Found Symp.* 1986; 118:196-210.
- 3 Ahrens I, Ellwanger C, Smith BK et al. Selenium supplementation induces metalloproteinase-dependent L-selectin shedding from monocytes. *J Leukoc Biol.* 2008; 83:1388-95.
- 4 Aird WC. Vascular bed-specific hemostasis: role of endothelium in sepsis pathogenesis. *Crit Care Med.* 2001; 29:S28-34; discussion S34-5.
- 5 Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood.* 2003; 101:3765-77.
- 6 Ancuta P, Rao R, Moses A et al. Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. *J Exp Med.* 2003; 197:1701-7.
- 7 Aras O, Shet A, Bach RR et al. Induction of microparticle- and cell-associated intravascular tissue factor in human endotoxemia. *Blood.* 2004; 103:4545-53.
- 8 Asakura H, Wada H, Okamoto K et al. Evaluation of haemostatic molecular markers for diagnosis of disseminated intravascular coagulation in patients with infections. *Thromb Haemost.* 2006; 95:282-7.
- 9 Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2009; 27:669-92.
- 10 Bar-Shavit R, Kahn A, Wilner GD, Fenton JW2. Monocyte chemotaxis: stimulation by specific exosite region in thrombin. *Science.* 1983; 220:728-31.
- 11 Baudo F, Caimi TM, de Cataldo F et al. Antithrombin III (ATIII) replacement therapy in patients with sepsis and/or postsurgical complications: a controlled double-blind, randomized, multicenter study. *Intensive Care Med.* 1998; 24:336-42.
- 12 Bauer KA, Kass BL, ten Cate H, Hawiger JJ, Rosenberg RD. Factor IX is activated in vivo by the tissue factor mechanism. *Blood.* 1990; 76:731-6.
- 13 Bazil V, Baudys M, Hilgert I et al. Structural relationship between the soluble and membrane-bound forms of human monocyte surface glycoprotein CD14. *Mol Immunol.* 1989; 26:657-62.
- 14 Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med.* 2001; 344:699-709.

- 15** Berner R, Furll B, Stelter F, Droese J, Muller H, Schutt C. Elevated levels of lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 in plasma in neonatal early-onset sepsis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002; 9:440-5.
- 16** Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone MAJ, Seed B. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science.* 1989; 243:1160-5.
- 17** Bevilacqua M, Butcher E, Furie B et al. Selectins: a family of adhesion receptors. *Cell.* 1991; 67:233.
- 18** Bhakdi S, Klonisch T, Nuber P, Fischer W. Stimulation of monokine production by lipoteichoic acids. *Infect Immun.* 1991; 59:4614-20.
- 19** Biemond BJ, Levi M, ten Cate H et al. Complete inhibition of endotoxin-induced coagulation activation in chimpanzees with a monoclonal Fab fragment against factor VII/VIIa. *Thromb Haemost.* 1995; 73:223-30.
- 20** Biemond BJ, Levi M, Ten Cate H et al. Plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor I release during experimental endotoxaemia in chimpanzees: effect of interventions in the cytokine and coagulation cascades. *Clin Sci (Lond).* 1995; 88:587-94.
- 21** Bingisser R, Stey C, Weller M, Groscurth P, Russi E, Frei K. Apoptosis in human alveolar macrophages is induced by endotoxin and is modulated by cytokines. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1996; 15:64-70.
- 22** Bone RC. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med.* 1996; 24:1125-8.
- 23** Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest.* 1997; 112:235-43.
- 24** Brandtzaeg P, Sandset PM, Joo GB, Ovstebo R, Abildgaard U, Kierulf P. The quantitative association of plasma endotoxin, antithrombin, protein C, extrinsic pathway inhibitor and fibrinopeptide A in systemic meningococcal disease. *Thromb Res.* 1989; 55:459-70.
- 25** Brandtzaeg P, Bjerre A, Ovstebo R, Brusletto B, Joo GB, Kierulf P. Neisseria meningitidis lipopolysaccharides in human pathology. *J Endotoxin Res.* 2001; 7:401-20.
- 26** Brown NJ, Nadeau JH, Vaughan DE. Selective stimulation of tissue-type plasminogen activator (t-PA) in vivo by infusion of bradykinin. *Thromb Haemost.* 1997; 77:522-5.
- 27** Bufler P, Stiegler G, Schuchmann M et al. Soluble lipopolysaccharide receptor (CD14) is released via two different mechanisms from human monocytes and CD14 transfectants. *Eur J Immunol.* 1995; 25:604-10.

- 28** Butenas S, Bouchard BA, Brummel-Ziedins KE, Parhami-Seren B, Mann KG. Tissue factor activity in whole blood. *Blood*. 2005; 105:2764-70.
- 29** Camerer E, Cornelissen I, Kataoka H, Duong DN, Zheng Y, Coughlin SR. Roles of protease-activated receptors in a mouse model of endotoxemia. *Blood*. 2006; 107:3912-21.
- 30** Camerini D, James SP, Stamenkovic I, Seed B. Leu-8/TQ1 is the human equivalent of the Mel-14 lymph node homing receptor. *Nature*. 1989; 342:78-82.
- 31** Constantinescu AA, Berendes PB, Levin M. Disseminated intravascular coagulation and a negative D-dimer test. *Neth J Med*. 2007; 65:398-400.
- 32** Conway EM, Rosenberg RD. Tumor necrosis factor suppresses transcription of the thrombomodulin gene in endothelial cells. *Mol Cell Biol*. 1988; 8:5588-92.
- 33** Crawley JTB, Lane DA. The haemostatic role of tissue factor pathway inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008; 28:233-42.
- 34** De Pont AJM, Bakhtiari K, Hutten BA et al. Endotoxaemia induces resistance to activated protein C in healthy humans. *Br J Haematol*. 2006; 134:213-9.
- 35** De Smedt T, Pajak B, Muraille E et al. Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *J Exp Med*. 1996; 184:1413-24.
- 36** de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med*. 1991; 174:1209-20.
- 37** Dempfle CE, Pfitzner SA, Dollman M, Huck K, Stehle G, Heene DL. Comparison of immunological and functional assays for measurement of soluble fibrin. *Thromb Haemost*. 1995; 74:673-9.
- 38** Dempfle CE. The use of soluble fibrin in evaluating the acute and chronic hypercoagulable state. *Thromb Haemost*. 1999; 82:673-83.
- 39** Dempfle C, Wurst M, Smolinski M et al. Use of soluble fibrin antigen instead of D-dimer as fibrin-related marker may enhance the prognostic power of the ISTH overt DIC score. *Thromb Haemost*. 2004; 91:812-8.
- 40** Dickneite G. Antithrombin III in animal models of sepsis and organ failure. *Semin Thromb Hemost*. 1998; 24:61-9.
- 41** Dieter P, Scheibe R, Kamionka S, Kolada A. LPS-induced synthesis and release of PGE2 in liver macrophages: regulation by CPLA2, COX-1, COX-2, and PGE2 synthase. *Adv Exp Med Biol*. 2002; 507:457-62.
- 42** Dobrovolskaia MA, Vogel SN. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes Infect*. 2002; 4:903-14.

- 43** Eckle I, Seitz R, Egbring R, Kolb G, Havemann K. Protein C degradation in vitro by neutrophil elastase. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1991; 372:1007-13.
- 44** Egorina EM, Sovershaev MA, Bjorkoy G et al. Intracellular and surface distribution of monocyte tissue factor: application to intersubject variability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25:1493-8.
- 45** Eisele B, Lamy M, Thijs LG et al. Antithrombin III in patients with severe sepsis. A randomized, placebo-controlled, double-blind multicenter trial plus a meta-analysis on all randomized, placebo-controlled, double-blind trials with antithrombin III in severe sepsis. *Intensive Care Med*. 1998; 24:663-72.
- 46** Engel C, Brunkhorst FM, Bone H et al. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med*. 2007; 33:606-18.
- 47** Faust SN, Heyderman RS, Levin M. Coagulation in severe sepsis: a central role for thrombomodulin and activated protein C. *Crit Care Med*. 2001; 29 (7 Suppl): S62-7.
- 48** Faust SN, Levin M, Harrison OB et al. Dysfunction of endothelial protein C activation in severe meningococcal sepsis. *N Engl J Med*. 2001; 345:408-16.
- 49** Feistritzer C, Riewald M. Endothelial barrier protection by activated protein C through PAR1-dependent sphingosine 1-phosphate receptor-1 crossactivation. *Blood*. 2005; 105:3178-84.
- 50** Ferri LE, Swartz D, Christou NV. Soluble L-selectin at levels present in septic patients diminishes leukocyte-endothelial cell interactions in mice in vivo: a mechanism for decreased leukocyte delivery to remote sites in sepsis. *Crit Care Med*. 2001; 29:117-22.
- 51** Ferri LE, Chia S, Benay C, Giannias B, Christou NV. L-selectin shedding in sepsis limits leukocyte mediated microvascular injury at remote sites. *Surgery*. 2009; 145:384-91.
- 52** Fey GH, Hocke GM, Wilson DR et al. Cytokines and the acute phase response of the liver. In: Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Schachter DA, Shafritz. The liver: biology and pathobiology. New York, N.Y.: Raven Press; 1994:113-143.
- 53** Figueras-Aloy J, Gomez-Lopez L, Rodriguez-Miguel J et al. Serum soluble ICAM-1, VCAM-1, L-selectin, and P-selectin levels as markers of infection and their relation to clinical severity in neonatal sepsis. *Am J Perinatol*. 2007; 24:331-8.
- 54** Fourrier F, Chopin C, Goudemand J et al. Septic shock, multiple organ failure, and disseminated intravascular coagulation. Compared patterns of antithrombin III, protein C, and protein S deficiencies. *Chest*. 1992; 101:816-23.

- 55** Fourrier F, Chopin C, Huart JJ, Runge I, Caron C, Goudemand J. Double-blind, placebo-controlled trial of antithrombin III concentrates in septic shock with disseminated intravascular coagulation. *Chest*. 1993; 104:882-8.
- 56** Franco RF, de Jonge E, Dekkers PE et al. The in vivo kinetics of tissue factor messenger RNA expression during human endotoxemia: relationship with activation of coagulation. *Blood*. 2000; 96:554-9.
- 57** Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*. 2001; 294:1871-5.
- 58** Gailani D, Broze GJJ. Factor XI activation in a revised model of blood coagulation. *Science*. 1991; 253:909-12.
- 59** Gando S, Kameue T, Nanzaki S, Nakanishi Y. Cytokines, soluble thrombomodulin and disseminated intravascular coagulation in patients with systemic inflammatory response syndrome. *Thromb Res*. 1995; 80:519-26.
- 60** Gando S, Nanzaki S, Sasaki S, Aoi K, Kemmotsu O. Activation of the extrinsic coagulation pathway in patients with severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med*. 1998; 26:2005-9.
- 61** Gando S, Kameue T, Matsuda N, Hayakawa M, Hoshino H, Kato H. Serial changes in neutrophil-endothelial activation markers during the course of sepsis associated with disseminated intravascular coagulation. *Thromb Res*. 2005; 116:91-100.
- 62** Gelehrter TD, Sznycer-Laszuk R. Thrombin induction of plasminogen activator-inhibitor in cultured human endothelial cells. *J Clin Invest*. 1986; 77:165-9.
- 63** Giamarellos-Bourboulis EJ, Routsis C, Plachouras D et al. Early apoptosis of blood monocytes in the septic host: is it a mechanism of protection in the event of septic shock? *Crit Care*. 2006; 10:R76.
- 64** Giebler R, Schmidt U, Koch S, Peters J, Scherer R. Combined antithrombin III and C1-esterase inhibitor treatment decreases intravascular fibrin deposition and attenuates cardiorespiratory impairment in rabbits exposed to *Escherichia coli* endotoxin. *Crit Care Med*. 1999; 27:597-604.
- 65** Giles AR, Nesheim ME, Herring SW, Hoogendoorn H, Stump DC, Heldebrant CM. The fibrinolytic potential of the normal primate following the generation of thrombin in vivo. *Thromb Haemost*. 1990; 63:476-81.
- 66** Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5:953-64.
- 67** Griffin JD, Spertini O, Ernst TJ et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines regulate surface expression of the leukocyte adhesion molecule-1 on human neutrophils, monocytes, and their precursors. *J Immunol*. 1990; 145:576-84.

- 68** Grignani G, Maiolo A. Cytokines and hemostasis. *Haematologica*. 2000; 85:967-72.
- 69** Hasan AA, Amenta S, Schmaier AH. Bradykinin and its metabolite, Arg-Pro-Gly-Phe, are selective inhibitors of alpha-thrombin-induced platelet activation. *Circulation*. 1996; 94:517-28.
- 70** Hemker HC, Beguin S. Thrombin generation in plasma: its assessment via the endogenous thrombin potential. *Thromb Haemost*. 1995; 74:134-8.
- 71** Hills BA, Butler BD, Lichtenberger LM. Gastric mucosal barrier: hydrophobic lining to the lumen of the stomach. *Am J Physiol*. 1983; 244:G561-8.
- 72** Hozumi H, Adachi Y, Murakami T, Miura NN, Ohno N. Increment of plasma soluble CD14 level in carrageenan-primed endotoxin shock model mice. *Biol Pharm Bull*. 2006; 29:1015-21.
- 73** Iba T, Kidokoro A. High-dose antithrombin therapy for sepsis: mechanisms of action. *Shock*. 2002; 18:389-94.
- 74** Inthorn D, Hoffmann JN, Hartl WH, Muhl bayer D, Jochum M. Antithrombin III supplementation in severe sepsis: beneficial effects on organ dysfunction. *Shock*. 1997; 8:328-34.
- 75** Inthorn D, Hoffmann JN, Hartl WH, Muhl bayer D, Jochum M. Effect of antithrombin III supplementation on inflammatory response in patients with severe sepsis. *Shock*. 1998; 10: 90-96.
- 76** Isermann B, Vinnikov IA, Madhusudhan T et al. Activated protein C protects against diabetic nephropathy by inhibiting endothelial and podocyte apoptosis. *Nat Med*. 2007; 13:1349-58.
- 77** Iwasaki H, Akashi K. Myeloid lineage commitment from the hematopoietic stem cell. *Immunity*. 2007; 26:726-40.
- 78** Jackson SK. Role of lipid metabolites in the signalling and activation of macrophage cells by lipopolysaccharide. *Prog Lipid Res*. 1997; 36:227-44.
- 79** Jacque B, Stephan K, Smirnova I, Kim B, Gilling D, Poltorak A. Mice expressing high levels of soluble CD14 retain LPS in the circulation and are resistant to LPS-induced lethality. *Eur J Immunol*. 2006; 36:3007-16.
- 80** Jagneaux T, Taylor DE, Kantrow SP. Coagulation in sepsis. *Am J Med Sci*. 2004; 328:196-204.
- 81** Jochum M, Lander S, Heimbürger N, Fritz H. Effect of human granulocytic elastase on isolated human antithrombin III. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*. 1981; 362:103-12.

- 82** Jochum M. Influence of high-dose antithrombin concentrate therapy on the release of cellular proteinases, cytokines, and soluble adhesion molecules in acute inflammation. *Semin Hematol.* 1995; 32:19-32.
- 83** Johnson K, Choi Y, DeGroot E, Samuels I, Creasey A, Aarden L. Potential mechanisms for a proinflammatory vascular cytokine response to coagulation activation. *J Immunol.* 1998; 160:5130-5.
- 84** Kahn ML, Nakanishi-Matsui M, Shapiro MJ, Ishihara H, Coughlin SR. Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *J Clin Invest.* 1999; 103:879-87.
- 85** Kakkar AK, DeRuvo N, Chinswangwatanakul V, Tebbutt S, Williamson RC. Extrinsic-pathway activation in cancer with high factor VIIa and tissue factor. *Lancet.* 1995; 346:1004-5.
- 86** Kaneider NC, Leger AJ, Agarwal A et al. 'Role reversal' for the receptor PAR1 in sepsis-induced vascular damage. *Nat Immunol.* 2007; 8:1303-12.
- 87** Kang YH, Lee CH, Monroy RL, Dwivedi RS, Odeyale C, Newball HH. Uptake, distribution and fate of bacterial lipopolysaccharides in monocytes and macrophages: an ultrastructural and functional correlation. *Electron Microsc Rev.* 1992; 5:381-419.
- 88** Kario K, Matsuo T, Kodama K, Matsuo M, Yamamoto K, Kobayashi H. Imbalance between thrombin and plasmin activity in disseminated intravascular coagulation. Assessment by the thrombin-antithrombin-III complex/plasmin-alpha-2-antiplasmin complex ratio. *Haemostasis.* 1992; 22:179-86.
- 89** Kaufman N, Page JD, Pixley RA, Schein R, Schmaier AH, Colman RW. Alpha 2-macroglobulin-kallikrein complexes detect contact system activation in hereditary angioedema and human sepsis. *Blood.* 1991; 77:2660-7.
- 90** Keller R, Fischer W, Keist R, Bassetti S. Macrophage response to bacteria: induction of marked secretory and cellular activities by lipoteichoic acids. *Infect Immun.* 1992; 60:3664-72.
- 91** Kinasevitz GT, Yan SB, Basson B et al. Universal changes in biomarkers of coagulation and inflammation occur in patients with severe sepsis, regardless of causative micro-organism [ISRCTN74215569]. *Crit Care.* 2004; 8:R82-90.
- 92** Kobayashi M, Shimada K, Ozawa T. Human recombinant interleukin-1 beta- and tumor necrosis factor alpha-mediated suppression of heparin-like compounds on cultured porcine aortic endothelial cells. *J Cell Physiol.* 1990; 144:383-90.
- 93** Kourtis AP, Lee FK, Stoll BJ. Soluble L-selectin, a marker of immune activation, in neonatal infection. *Clin Immunol.* 2003; 109:224-8.
- 94** Koyama T, Nishida K, Ohdama S et al. Determination of plasma tissue factor antigen and its clinical significance. *Br J Haematol.* 1994; 87:343-7.

- 95** Lasky LA, Singer MS, Yednock TA et al. Cloning of a lymphocyte homing receptor reveals a lectin domain. *Cell*. 1989; 56:1045-55.
- 96** Levi M, ten Cate H, Bauer KA et al. Inhibition of endotoxin-induced activation of coagulation and fibrinolysis by pentoxifylline or by a monoclonal anti-tissue factor antibody in chimpanzees. *J Clin Invest*. 1994; 93:114-20.
- 97** Levi M, de Jonge E, van der Poll T, ten Cate H. Disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost*. 1999; 82:695-705.
- 98** Levi M. Keep in contact: the role of the contact system in infection and sepsis. *Crit Care Med*. 2000; 28:3765-6.
- 99** Levi M. Disseminated intravascular coagulation: What's new? *Crit Care Clin*. 2005; 21:449-67.
- 100** Levi M. Activated protein C in sepsis: a critical review. *Curr Opin Hematol*. 2008; 15:481-6.
- 101** Lien E, Ingalls RR. Toll-like receptors. *Crit Care Med*. 2002; 30:S1-11.
- 102** Lilja I, Dimberg J, Sjodahl R, Tagesson C, Gustafson-Svard C. Effects of endotoxin and dexamethasone on group I and II phospholipase A2 in rat ileum and stomach. *Gut*. 1994; 35:40-5.
- 103** Liu K, Victora GD, Schwickert TA et al. In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science*. 2009; 324:392-7.
- 104** Lorente JA, Garcia-Frade LJ, Landin L et al. Time course of hemostatic abnormalities in sepsis and its relation to outcome. *Chest*. 1993; 103:1536-42.
- 105** Mackman N. Role of tissue factor in hemostasis and thrombosis. *Blood Cells Mol Dis*. 2006; 36:104-7.
- 106** Mammen EF. Clinical relevance of antithrombin deficiencies. *Semin Hematol*. 1995; 32:2-6; discussion 7.
- 107** Mammen EF. Antithrombin: its physiological importance and role in DIC. *Semin Thromb Hemost*. 1998; 24:19-25.
- 108** Mangan DF, Wahl SM. Differential regulation of human monocyte programmed cell death (apoptosis) by chemotactic factors and pro-inflammatory cytokines. *J Immunol*. 1991; 147:3408-12.
- 109** Mangan DF, Welch GR, Wahl SM. Lipopolysaccharide, tumor necrosis factor-alpha, and IL-1 beta prevent programmed cell death (apoptosis) in human peripheral blood monocytes. *J Immunol*. 1991; 146:1541-6.
- 110** Martich GD, Boujoukos AJ, Suffredini AF. Response of man to endotoxin. *Immunobiology*. 1993; 187:403-16.

- 111** Mavromatis BH, Kessler CM. D-dimer testing: the role of the clinical laboratory in the diagnosis of pulmonary embolism. *J Clin Pathol.* 2001; 54:664-8.
- 112** McGill SN, Ahmed NA, Hu F, Michel RP, Christou NV. Shedding of L-selectin as a mechanism for reduced polymorphonuclear neutrophil exudation in patients with the systemic inflammatory response syndrome. *Arch Surg.* 1996; 131:1141-6.
- 113** Mesters RM, Mannucci PM, Coppola R, Keller T, Ostermann H, Kienast J. Factor VIIa and antithrombin III activity during severe sepsis and septic shock in neutropenic patients. *Blood.* 1996; 88:881-6.
- 114** Mesters RM, Helterbrand J, Utterback BG et al. Prognostic value of protein C concentrations in neutropenic patients at high risk of severe septic complications. *Crit Care Med.* 2000; 28:2209-16.
- 115** Minnema MC, Pajkrt D, Willemin WA et al. Activation of clotting factor XI without detectable contact activation in experimental human endotoxemia. *Blood.* 1998; 92:3294-301.
- 116** Miyasato M, Taguchi K, Tsuda S, Kitamura N, Kato K. Eosinophil chemiluminescence response to cytokines and opsonized zymosans in atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol.* 1994; 104 Suppl 1:24-6.
- 117** Monroe DM, Key NS. The tissue factor-factor VIIa complex: procoagulant activity, regulation, and multitasking. *J Thromb Haemost.* 2007; 5:1097-105.
- 118** Moore KL, Andreoli SP, Esmon NL, Esmon CT, Bang NU. Endotoxin enhances tissue factor and suppresses thrombomodulin expression of human vascular endothelium in vitro. *J Clin Invest.* 1987; 79:124-30.
- 119** Moraes TJ, Downey GP. Death of the septic monocyte: is more better? *Crit Care.* 2006; 10:146.
- 120** Mosesson MW. The roles of fibrinogen and fibrin in hemostasis and thrombosis. *Semin Hematol.* 1992; 29:177-88.
- 121** Murakami M, Kudo I. Secretory phospholipase A2. *Biol Pharm Bull.* 2004; 27:1158-64.
- 122** Murugesan G, Rani MR, Ransohoff RM, Marchant RE, Kottke-Marchant K. Endothelial cell expression of monocyte chemotactic protein-1, tissue factor, and thrombomodulin on hydrophilic plasma polymers. *J Biomed Mater Res.* 2000; 49:396-408.
- 123** Naik SH, Metcalf D, van Nieuwenhuijze A et al. Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes. *Nat Immunol.* 2006; 7:663-71.
- 124** Nawroth PP, Stern DM. Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor. *J Exp Med.* 1986; 163:740-5.

- 125** Niessen F, Schaffner F, Furlan-Freguia C et al. Dendritic cell PAR1-S1P3 signalling couples coagulation and inflammation. *Nature*. 2008; 452:654-8.
- 126** Novotny WF, Brown SG, Miletich JP, Rader DJ, Broze GJJ. Plasma antigen levels of the lipoprotein-associated coagulation inhibitor in patient samples. *Blood*. 1991; 78:387-93.
- 127** Nuijens JH, Huijbregts CC, Eerenberg-Belmer AJ et al. Quantification of plasma factor XIIa-Cl(-)-inhibitor and kallikrein-Cl(-)-inhibitor complexes in sepsis. *Blood*. 1988; 72:1841-8.
- 128** Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity. *Shock*. 2001; 16:83-96.
- 129** Okajima K, Uchiba M, Murakami K, Okabe H, Takatsuki K. Determination of plasma soluble fibrin using a new ELISA method in patients with disseminated intravascular coagulation. *Am J Hematol*. 1996; 51:186-91.
- 130** Opal SM. Phylogenetic and functional relationships between coagulation and the innate immune response. *Crit Care Med*. 2000; 28:S77-80.
- 131** Opal SM. Therapeutic rationale for antithrombin III in sepsis. *Crit Care Med*. 2000; 28:S34-7.
- 132** Opal SM, Garber GE, LaRosa SP et al. Systemic host responses in severe sepsis analyzed by causative microorganism and treatment effects of drotrecogin alfa (activated). *Clin Infect Dis*. 2003; 37:50-8.
- 133** Osterud B, Rapaport SI. Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977; 74:5260-4.
- 134** Osterud B, Flaegstad T. Increased tissue thromboplastin activity in monocytes of patients with meningococcal infection: related to an unfavourable prognosis. *Thromb Haemost*. 1983; 49:5-7.
- 135** Osterud B. Tissue factor expression by monocytes: regulation and pathophysiological roles. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1998; 9 Suppl 1:S9-14.
- 136** Ostrovsky L, Woodman RC, Payne D, Teoh D, Kubes P. Antithrombin III prevents and rapidly reverses leukocyte recruitment in ischemia/reperfusion. *Circulation*. 1997; 96:2302-10.
- 137** Pannen BH, Robotham JL. The acute-phase response. *New Horiz*. 1995; 3:183-97.
- 138** Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood*. 1989; 74:2527-34.

- 139** Pavcnik-Arnol M, Hojker S, Derganc M. Lipopolysaccharide-binding protein, lipopolysaccharide, and soluble CD14 in sepsis of critically ill neonates and children. *Intensive Care Med.* 2007; 33:1025-32.
- 140** Pawlinski R, Pedersen B, Schabbauer G et al. Role of tissue factor and protease-activated receptors in a mouse model of endotoxemia. *Blood.* 2004; 103:1342-7.
- 141** Petrone WF, English DK, Wong K, McCord JM. Free radicals and inflammation: superoxide-dependent activation of a neutrophil chemotactic factor in plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980; 77:1159-63.
- 142** Pinsky MR. Immune balance in critically ill patients. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2000; 48:439-42.
- 143** Pixley RA, De La Cadena R, Page JD et al. The contact system contributes to hypotension but not disseminated intravascular coagulation in lethal bacteremia. In vivo use of a monoclonal anti-factor XII antibody to block contact activation in baboons. *J Clin Invest.* 1993; 91:61-8.
- 144** Pruzanski W, Wilmore DW, Suffredini A et al. Hyperphospholipasemia A2 in human volunteers challenged with intravenous endotoxin. *Inflammation.* 1992; 16:561-70.
- 145** Redlitz A, Tan AK, Eaton DL, Plow EF. Plasma carboxypeptidases as regulators of the plasminogen system. *J Clin Invest.* 1995; 96:2534-8.
- 146** Rijkers DT, Wielders SJ, Beguin S, Hemker HC. Prevention of the influence of fibrin and alpha2-macroglobulin in the continuous measurement of the thrombin potential: implications for an endpoint determination of the optical density. *Thromb Res.* 1998; 89:161-9.
- 147** Sakata Y, Loskutoff DJ, Gladson CL, Hekman CM, Griffin JH. Mechanism of protein C-dependent clot lysis: role of plasminogen activator inhibitor. *Blood.* 1986; 68:1218-23.
- 148** Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med.* 1994; 179:1109-18.
- 149** Samuelsson B. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science.* 1983; 220:568-75.
- 150** Satta N, Toti F, Feugeas O et al. Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide. *J Immunol.* 1994; 153:3245-55.

- 151** Sawai T, Lampman R, Hua Y et al. Lysophosphatidylcholine alters enterocyte monolayer permeability via a protein kinase C/Ca²⁺ mechanism. *Pediatr Surg Int.* 2002; 18:591-4.
- 152** Schaloske RH, Dennis EA. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1761:1246-59.
- 153** Schleiffenbaum B, Spertini O, Tedder TF. Soluble L-selectin is present in human plasma at high levels and retains functional activity. *J Cell Biol.* 1992; 119:229-38.
- 154** Schmaier AH, Rojkaer R, Shariat-Madar Z. Activation of the plasma kallikrein/kinin system on cells: a revised hypothesis. *Thromb Haemost.* 1999; 82:226-33.
- 155** Schuster HP; Eisele B; Keinecke HO. S-antithrombin III study: antithrombin III in patients with sepsis. *Intensive Care Med.* 1998;Suppl 1: 76.
- 156** Schwartz ML, Pizzo SV, Hill RL, McKee PA. The subunit structures of human plasma and platelet factor XIII (fibrin-stabilizing factor). *J Biol Chem.* 1971; 246:5851-4.
- 157** Seidelin JB, Nielsen OH, Strom J. Soluble L-selectin levels predict survival in sepsis. *Intensive Care Med.* 2002; 28:1613-8.
- 158** Shorr AF, Trotta RF, Alkins SA, Hanzel GS, Diehl LF. D-dimer assay predicts mortality in critically ill patients without disseminated intravascular coagulation or venous thromboembolic disease. *Intensive Care Med.* 1999; 25:207-10.
- 159** Siegel JP. Assessing the use of activated protein C in the treatment of severe sepsis. *N Engl J Med.* 2002; 347:1030-4.
- 160** Siegelman MH, van de Rijn M, Weissman IL. Mouse lymph node homing receptor cDNA clone encodes a glycoprotein revealing tandem interaction domains. *Science.* 1989; 243:1165-72.
- 161** Smith D, Gilbert M, Owen WG. Tissue plasminogen activator release in vivo in response to vasoactive agents. *Blood.* 1985; 66:835-9.
- 162** Soejima H, Ogawa H, Yasue H et al. Heightened tissue factor associated with tissue factor pathway inhibitor and prognosis in patients with unstable angina. *Circulation.* 1999; 99:2908-13.
- 163** Song D, Ye X, Xu H, Liu SF. Activation of endothelial intrinsic NF-kappaB pathway impairs protein C anticoagulation mechanism and promotes coagulation in endotoxemic mice. *Blood.* 2009; 114:2521-9.
- 164** Spertini O, Schleiffenbaum B, White-Owen C, Ruiz PJ, Tedder TF. ELISA for quantitation of L-selectin shed from leukocytes in vivo. *J Immunol Methods.* 1992; 156:115-23.

- 165** Stief TW. Arginine conserves the hemostasis activation state of plasma even against freezing/thawing. In: Diamino Amino Acids; Schäfer HA, Wohlbier LM, eds; Nova Science Publishers, New York, 2008; pp. 219-33.
- 166** Stief TW, Richter A, Bänder R, Maisch B, Renz H. Functional determination of plasmin in arginine-stabilized plasma. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2005; 11:303-9.
- 167** Stief TW. Specific determination of plasmatic thrombin activity. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2006; 12:324-9.
- 168** Stief TW. Thrombin generation by exposure of blood to endotoxin: a simple model to study disseminated intravascular coagulation. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2006; 12:137-61.
- 169** Stief TW. The fibrinogen antigenic turbidimetric assay (FIATA): the X2x test--the corrected chi-square comparison against the control-mean. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2007; 13:73-100.
- 170** Stief TW. Determination of active endotoxin in plasma. *Hemostasis Laboratory.* 2008; 1:41 -51.
- 171** Stief TW. The fibrinogen functional turbidimetric assay. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2008; 14:84-96.
- 172** Stief TW; Max M. Active endotoxin in sepsis. *Hemostasis Laboratory.* 2008; 1:53-60.
- 173** Suefuji H, Ogawa H, Yasue H et al. Increased plasma tissue factor levels in acute myocardial infarction. *Am Heart J.* 1997; 134:253-9.
- 174** Suffredini AF, Harpel PC, Parrillo JE. Promotion and subsequent inhibition of plasminogen activation after administration of intravenous endotoxin to normal subjects. *N Engl J Med.* 1989; 320:1165-72.
- 175** Szewczenko-Pawlikowski M, Kozak W. Accumulation of unsaturated lipids in monocytes during early phase pyrogen tolerance. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1484:183-94.
- 176** Szotowski B, Antoniak S, Rauch U. Alternatively spliced tissue factor: a previously unknown piece in the puzzle of hemostasis. *Trends Cardiovasc Med.* 2006; 16:177-82.
- 177** Tacke F, Randolph GJ. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology.* 2006; 211:609-18.
- 178** Tagesson C; Sjö Dahl R; Thoren B. Passage of molecules through the wall of the gastrointestinal tract. *Scand J Gastroenterol.* 1987; 13:519-524.
- 179** Tanowitz HB, Chan J. Gram-positive sepsis. *Crit Care Med.* 2000; 28:3081-2.

- 180** Taylor FBJ, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S et al. The endothelial cell protein C receptor aids in host defense against *Escherichia coli* sepsis. *Blood*. 2000; 95:1680-6.
- 181** Tedder TF, Isaacs CM, Ernst TJ, Demetri GD, Adler DA, Disteché CM. Isolation and chromosomal localization of cDNAs encoding a novel human lymphocyte cell surface molecule, LAM-1. Homology with the mouse lymphocyte homing receptor and other human adhesion proteins. *J Exp Med*. 1989; 170:123-33.
- 182** Tedder TF, Matsuyama T, Rothstein D, Schlossman SF, Morimoto C. Human antigen-specific memory T cells express the homing receptor (LAM-1) necessary for lymphocyte recirculation. *Eur J Immunol*. 1990; 20:1351-5.
- 183** Ten Cate H, Bauer KA, Levi M et al. The activation of factor X and prothrombin by recombinant factor VIIa in vivo is mediated by tissue factor. *J Clin Invest*. 1993; 92:1207-12.
- 184** Ten Cate H. Thrombocytopenia: one of the markers of disseminated intravascular coagulation. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2003; 33:413-6.
- 185** Touqui L, Alaoui-El-Azher M. Mammalian secreted phospholipases A2 and their pathophysiological significance in inflammatory diseases. *Curr Mol Med*. 2001; 1:739-54.
- 186** Trent MS, Stead CM, Tran AX, Hankins JV. Diversity of endotoxin and its impact on pathogenesis. *J Endotoxin Res*. 2006; 12:205-23.
- 187** Tsiotou AG, Sakorafas GH, Anagnostopoulos G, Bramis J. Septic shock; current pathogenetic concepts from a clinical perspective. *Med Sci Monit*. 2005; 11:RA76-85.
- 188** Turk B, Brieditis I, Bock SC, Olson ST, Bjork I. The oligosaccharide side chain on Asn-135 of alpha-antithrombin, absent in beta-antithrombin, decreases the heparin affinity of the inhibitor by affecting the heparin-induced conformational change. *Biochemistry*. 1997; 36:6682-91.
- 190** Vadas P, Scott K, Smith G et al. Serum phospholipase A2 enzyme activity and immunoreactivity in a prospective analysis of patients with septic shock. *Life Sci*. 1992; 50:807-11.
- 191** Vallet B. Microthrombosis in sepsis. *Minerva Anesthesiol*. 2001; 67:298-301.
- 192** Van der Poll T, van Deventer SJ. Cytokines and anticytokines in the pathogenesis of sepsis. *Infect Dis Clin North Am*. 1999; 13:413-26, ix.
- 193** Van Hinsberg VW, Sprengers ED, Kooistra T. Effect of thrombin on the production of plasminogen activators and PA inhibitor-1 by human foreskin microvascular endothelial cells. *Thromb Haemost*. 1987; 57:148-53.

- 194** Varol C, Landsman L, Fogg DK et al. Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *J Exp Med*. 2007; 204:171-80.
- 195** Vary TC, Kimball SR. Regulation of hepatic protein synthesis in chronic inflammation and sepsis. *Am J Physiol*. 1992; 262:C445-52.
- 196** Vervloet MG, Thijs LG, Hack CE. Derangements of coagulation and fibrinolysis in critically ill patients with sepsis and septic shock. *Semin Thromb Hemost*. 1998; 24:33-44.
- 197** Visintin A, Mazzoni A, Spitzer JA, Segal DM. Secreted MD-2 is a large polymeric protein that efficiently confers lipopolysaccharide sensitivity to Toll-like receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98:12156-61.
- 198** Voves C, Wuillemin WA, Zeerleder S. International Society on Thrombosis and Haemostasis score for overt disseminated intravascular coagulation predicts organ dysfunction and fatality in sepsis patients. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2006; 17:445-51.
- 199** Wada H, Minamikawa K, Wakita Y et al. Hemostatic study before onset of disseminated intravascular coagulation. *Am J Hematol*. 1993; 43:190-4.
- 200** Wada H, Nakase T, Nakaya R et al. Elevated plasma tissue factor antigen level in patients with disseminated intravascular coagulation. *Am J Hematol*. 1994; 45:232-6.
- 201** Waldner H, Vollmar B, Conzen P et al. Enzymfreisetzung und Aktivierung der Kallikrein-Kinin-Systeme bei experimenteller Pankreatitis. Untersuchungen in Pfortaderblut, Pankreaslymphe und Peritonealexsudat. *Langenbecks Arch Chir*. 1993; 378:154-9.
- 202** Wang JE, Jorgensen PF, Almlof M et al. Peptidoglycan and lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* induce tumor necrosis factor alpha, interleukin 6 (IL-6), and IL-10 production in both T cells and monocytes in a human whole blood model. *Infect Immun*. 2000; 68:3965-70.
- 203** Warren BL, Eid A, Singer P et al. Caring for the critically ill patient. High-dose antithrombin III in severe sepsis: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2001; 286:1869-78.
- 204** Warren HS, Suffredini AF, Eichacker PQ, Munford RS. Risks and benefits of activated protein C treatment for severe sepsis. *N Engl J Med*. 2002; 347:1027-30.
- 205** Weber C, Belge KU, von Hundelshausen P et al. Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. *J Leukoc Biol*. 2000; 67:699-704.

- 206** White B, Schmidt M, Murphy C et al. Activated protein C inhibits lipopolysaccharide-induced nuclear translocation of nuclear factor kappaB (NF-kappaB) and tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) production in the THP-1 monocytic cell line. *Br J Haematol*. 2000; 110:130-4.
- 207** Wiedermann CJ, Kaneider NC. A systematic review of antithrombin concentrate use in patients with disseminated intravascular coagulation of severe sepsis. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2006; 17:521-6.
- 208** Wright SD. CD14 and innate recognition of bacteria. *J Immunol*. 1995; 155:6-8.
- 209** Willemin WA, Fijnvandraat K, Derkx BH et al. Activation of the intrinsic pathway of coagulation in children with meningococcal septic shock. *Thromb Haemost*. 1995; 74:1436-41.
- 210** Yan S, Chai H, Wang H et al. Effects of lysophosphatidylcholine on monolayer cell permeability of human coronary artery endothelial cells. *Surgery*. 2005; 138:464-73.
- 211** Yang RB, Mark MR, Gurney AL, Godowski PJ. Signaling events induced by lipopolysaccharide-activated toll-like receptor 2. *J Immunol*. 1999; 163:639-43.
- 212** Ziegler-Heitbrock HW, Fingerle G, Strobel M et al. *The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages*. ; 1993.
- 213** Ziegler-Heitbrock HW, Ulevitch RJ. CD14: cell surface receptor and differentiation marker. *Immunol Today*. 1993; 14:121-5.

Die Seiten 77-78 (Lebenslauf) enthalten persönliche Daten. Sie sind deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Marburg:

Adamkiewicz, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Baumann, Becker, Beyer, Bien, Boudriot, Cetin, Christiansen, Czubayko, Daut, del Rey, Dinges, Eilers, Feuser, Fuchs, Funck, Geks, Gerdes, Geus, Görg, Gotzen, Grau, Gress, Grimm, Griss, Grzeschik, Gudermann, Hamer, Hertl, Herzum, Höffken, Hörle, Hofbauer, Hofer, Hofmann, Hoyer, Jungclas, Kann, Kim-Berger, Klenk, Klose, König, Koolmann, Kreschmar, Krieg, Kroll, Kuhlmann, Kwee, Lang, Langer, Lemke, Lenz, Lill, Löffler, Lohoff, Lukasewitz, Maier, Maisch, Mandrek, Max, Moll, Moosdorf, Müller, Mutters, Neubauer, Oertel, Reichel, Remschmidt, Renz, Richter, Ritter, Röhm, Roeßler, Rothmund, Schäfer, Schmidt, Schnabel, Schneider, Schrader, Seitz, Sekundo, Steininger, Stief, Stiletto, Studer, von Garrel, Vogelmeier, Wagner, Weihe, Weiler, Werner, Westermann, Wilhelm, Wilke, Wündisch, Wulf

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei Herrn PD Dr. Stief für die angenehme und unkomplizierte Zusammenarbeit, die freundliche Empfehlung des Themas, sowie die geduldige Hilfe und Unterstützung, die mir von der Phase der Probengewinnung und -verarbeitung, bis letztlich zur kritischen und zügigen Durchsicht der Arbeit zuteil wurde, bedanken. Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Prof. Dr. Max, der als permanenter Ansprechpartner auf der Intensivstation 3 mit Rat und Tat zur Seite stand, das Gespräch mit Patienten und Angehörigen suchte und umfangreiche, unterstützende Hilfe bot.

Meine Freunde, Geschwister, Eltern sowie die Eltern meines Partners trugen durch wiederholtes Nachfragen, aufmunternde und manchmal auch kritische Kommentare, sowie Korrekturlesen der Arbeit maßgeblich zu ihrem Gelingen bei. Durch meine Freundin und Studienkollegin Ola Ijagha wurden die Tage im Labor angenehm und kurzweilig. Thilo Koch und Christian Arndt waren bei computertechnischen Problemen jederzeit da, wenn sie gebraucht wurden. Frau Wilma Hastedt erklärte wiederholt mit großer Geduld die Abläufe im Zentrallabor sowie die fachgerechte Bedienung der laborchemischen Geräte und überbrückte durch ihre freundliche Hilfe so manchen Engpass. Ihnen allen sei an dieser Stelle herzlich gedankt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Jörg Lauschke ohne dessen unermüdliche, liebevolle Unterstützung sowie motivierende Gespräche in Phasen der Frustration diese Arbeit ewig die „Unvollendete“ geblieben wäre.

Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Gerinnung bei schwerer Sepsis unter besonderer Berücksichtigung der Monozyten“ in der Abteilung für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik des Universitätsklinikums Marburg unter Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Renz mit Unterstützung durch Herrn PD Dr. Stief ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Die vorliegende Arbeit wurde im Journal „Blood, Coagulation and Fibrinolysis“ veröffentlicht.

Marburg, 20.04.2010